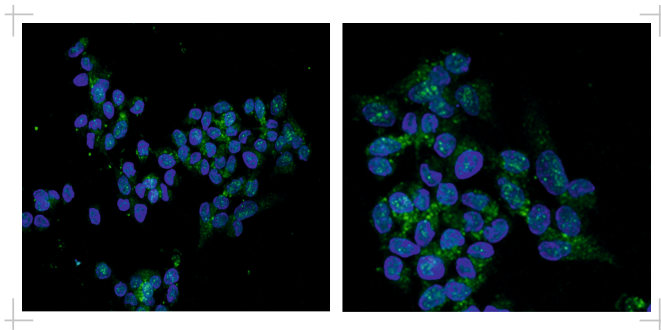


Klonierung zweier Rattensertolizelllinien mit stabiler Expression eines humanen Androgenrezeptors unterschiedlicher CAG-Repeat-Länge als in vitro Modell zur Untersuchung testosteronabhängiger, mit der Spermatogenese assoziierter Gene.



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**Klonierung zweier Rattensertolizelllinien mit stabiler Expression
eines humanen Androgenrezeptors unterschiedlicher
CAG-Repeat-Länge als in vitro Modell zur Untersuchung
testosteronabhängiger, mit der Spermatogenese assoziierter Gene.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dennis Lang

Tierarzt aus Bad Hersfeld

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Bergmann

Prof. Dr. Gerhard Schuler

Tag der Disputation: 19.05.2017

gewidmet
meiner Tochter Marie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1. <i>Einleitung und Ziele</i>	1
2. <i>Literaturübersicht</i>	4
2.1. Entwicklung und Histologie des Hodens	4
2.2. Zellpopulationen des Hodens	5
2.2.1. Sertolizellen	5
2.2.2. Keimzellen	6
2.2.3. Peritubuläre Myoidzellen	7
2.2.4. Leydig-Zellen	7
2.3. Spermatogenese	8
2.3.1. Ablauf der Spermatogenese	8
2.3.2. Spermiogenese	8
2.3.3. Kinetik der Spermatogenese	10
2.3.4. Störungen der Spermatogenese	12
2.3.5. Regulation der Spermatogenese	13
2.4. Regulation der Genexpression über Transkriptionsfaktoren	14
2.5. Der Androgenrezeptor (AR)	14
2.6. Das CAG-Repeat	18
2.7. Androgenabhängige Gene	20
2.8. Zellkultur	22
3. <i>Material und Methoden</i>	25
3.1. Klonierung humaner AR (CAG 18)	27
3.1.1. PCR humaner AR-Klon	27
3.1.2. Agarosegelelektrophorese	28
3.1.2.1. Detektion	29
3.1.3. TA-Klonierung des humanen AR	29

3.1.4.	DNA Mini-Präparation humane AR-Klone	32
3.1.5.	Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen	33
3.1.6.	Sequenzierung	35
3.2.	Klonierung humaner AR CAG14 und AR CAG36	36
3.2.1.	Sequenzierung	36
3.2.2.	Restriktionsdoppelpverda	36
3.2.3.	Extraktion der AR cDNAs aus Agarosegel	37
3.2.4.	Ligation	38
3.2.5.	DNA Mini-Präparation	39
3.2.6.	Kontrollverdau	39
3.2.7.	Sequenzierung	39
3.3.	Auswahl geeigneter Zelllinien für die Transfektion	40
3.3.1.	RNA Isolierung aus Sertoli-Zelllinien	40
3.3.2.	Aufreinigung der RNA	41
3.3.3.	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	41
3.3.4.	Amplifikation eines AR in Sertoli-Zelllinien	42
3.3.4.1.	Agarosegelelektrophorese und Detektion	43
3.4.	Transfektion hAR CAG 18 und CAG 36	44
3.4.1.	Zellkulturbedingungen 93RS2 Zellen	44
3.4.2.	Selektionsvorversuch	44
3.4.3.	Transformation der AR-Klone	45
3.4.4.	DNA-Midi Präparation	45
3.4.5.	Transfektion	47
3.4.6.	optische Kontrolle des Transfektionserfolgs	48
3.4.7.	Antibiotikaselektion	48
3.5.	Charakterisierung der transfizierten Zelllinien	49
3.5.1.	Immunfluoreszenz hAR	49
3.5.2.	RNA-Isolation aus transfizierten Zellen	50
3.5.3.	RNA Aufreinigung	50
3.5.4.	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	50
3.5.5.	Amplifikation hAR	50

3.5.5.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion	51
3.5.6. Western Blot	51
3.6. Stimulationsversuche 93RShAR18 und 93RShAR36	56
3.6.1. Testosteronstimulation	56
3.6.2. Zeitreihe Testosteronstimulation	56
3.6.3. Bestimmung der CAG-Repeat-Länge (PAGE-PCR)	57
3.6.3.1. Polyacrylamidgel	58
3.6.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion	58
3.6.4. Ermittlung der Housekeeper für RT-PCR	59
3.6.4.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion	60
3.7. Genexpressionsvergleich testosteronstimulierte Sertoli-Zelllinien	60
3.7.1. RNA-Isolation aus testosteronstimulierten Sertoli-Zelllinien	60
3.7.2. Aufreinigung der RNA	60
3.7.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	60
3.7.4. Real-time quantitative PCR	60
3.7.4.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion	62
3.7.5. Clusterin-ELISA (Enzym-linked Immunosorbant Assay)	63
3.7.5.1. Testosteronstimulation 48 h für ELISA	63
3.7.5.2. Probenvorbereitung für ELISA	64
3.7.5.3. ELISA	64
3.8. Statistik	65
4. Ergebnisse	67
4.1. Generierung humaner AR-Klone mit unterschiedlicher CAG-Repeat Länge	67
4.2. Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Transfektion des hAR	70
4.3. Charakterisierung von zwei neuen hAR exprimierenden Ratten Sertoli Zelllinien	72
4.3.1. Immunfluoreszenz	73
4.3.2. Amplifikation des hAR in den transfizierten Zelllinien	74
4.3.3. Western Blot	75
4.3.4. Zeitreihe Testosteronstimulation	76

4.3.5.	Bestimmung der CAG-Repeat-Länge (PAGE-PCR)	76
4.3.6.	Housekeeper-Platte	77
4.4.	Genexpressionsvergleich testosteronsimulierte Zelllinien	78
4.4.1.	Expression von AR und Clusterin ohne Testosteronstimulation	78
4.4.2.	Expressionsvergleich unter Testosteronstimulation	80
4.4.3.	ELISA	85
5.	<i>Diskussion</i>	87
6.	<i>Zusammenfassung</i>	95
7.	<i>Summary</i>	97
8.	<i>Literaturverzeichnis</i>	99
9.	<i>Anhang</i>	106

Abkürzungsverzeichnis

ABP	androgen binding protein
AF-1; -2	activation function 1, 2
AMH	Anti-Müller-Hormon
AIS	androgen insensitivity syndrome
AR	Androgenrezeptor
AREs	Androgen responsive elements
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CAG	Cytosin-Adenosin-Guanin
cDNA	complementary DNA
DAPI	4'6'-Diamidin-2-phenylindol
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FSH	follikelstimulierendes Hormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
hsp	heat shock proteins
LH	luteinisierendes Hormon
MM	Master-Mix
mRNA	messenger RNA
NTC	no template control, Negativkontrolle
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PSA	Prostata-spezifisches-Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SBMA	spinale bulbäre Muskelatrophie
T	Testosteron

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schema der Spermatogenese (modifiziert nach Bergmann 2005)
- Abb. 2: Keimtubulus in Paraffin, HE x40
- Abb. 3: Aufbau des Androgenrezeptors (AR)
- Abb. 4: Schema zur Funktionsweise von Kernrezeptoren
- Abb. 5: Methodische Vorgehensweise
- Abb. 6: Vektorkarten
- Abb. 7: Schmelzkurve Real-time quantitative PCR
- Abb. 8: PCR auf AR in Sertoli Zelllinien
- Abb. 9: 93RS2 Zellen
- Abb. 10: 93RS2 Zellen
- Abb. 11: 93RShAR18 Zellen
- Abb. 12: 93RShAR36 Zellen
- Abb. 13: Expression von hAR-GFP Konstrukt in 93RShAR18 Zellen
- Abb. 14: Expression von hAR-GFP Konstrukt in 93RShAR36 Zellen
- Abb. 15: Expression von hAR-GFP Konstrukt in 93RShAR18 Zellen
- Abb. 16: untransfizierte 93RS2 Zellen
- Abb. 17: PCR auf hAR in Sertoli Zellen
- Abb. 18: Western Blot hAR18 und hAR36
- Abb. 19: PAGE (Bestimmung der CAG-Repeat Länge)
- Abb. 20: Housekeeping-Gene Ratte
- Abb. 21: Expression von AR und Clusterin in 93RS2; 93RShAR18; 93RShAR36
- Abb. 22: PCR Produkte AR/Clusterin aus RT-PCR von 93RS2; 93RShAR18;
93RshAR33

VII

- Abb. 23: Expression von AR und Clusterin nach T in 93RShAR17
- Abb. 24: Expression von AR und Clusterin nach T in 93RShAR33
- Abb. 25: Expression von Clusterin nach T in 93RS2
- Abb. 26: Expression von Clusterin und AR nach T über 1 Stunde
- Abb. 27: ELISA

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Reagenzien; Volumina; PCR Programm Amplifikation AR <i>Trueclone</i> ®
Tab. 2:	Agarosegelelektrophorese Amplifikation AR <i>Trueclone</i> ®
Tab. 3:	Reagenzien; Volumina; Protokoll TA Konierungen
Tab. 4:	Protokoll Mini-Präparation
Tab. 5:	Reagenzien; Volumina; Kontrollverdau ARCAG18
Tab. 6:	Reagenzien; Volumina; Restriktionsdoppolverdau AR/CAG 18 und 36
Tab. 7:	Reagenzien; Volumina; Restriktionsdoppolverdau AR/CAG 14
Tab. 8:	Reagenzien; Volumina; <i>Gelextraktion QIAEX II</i>
Tab. 9:	Reagenzien; Volumina; Ligation AR cDNA-Fragmente
Tab. 10:	Transformation der Ligationsansätze mit chemisch kompetenten E.Coli
Tab. 11:	Reagenzien; Volumina; RNA Isolierung aus Sertoli Zelllinien
Tab. 12:	Reagenzien; Volumina; Protokoll RNA Aufreinigung
Tab. 13:	Reagenzien; Volumina; Protokoll cDNA Synthese
Tab. 14:	Reagenzien; Volumina; PCR auf AR in Sertoli Zelllinien
Tab. 15:	Selektionsversuch an untransfizierten 93RS2 Zellen
Tab. 16:	Reagenzien; Volumina; Transformation der AR-Klone
Tab. 17:	Reagenzien; Volumina; Midi-Präparation
Tab. 18:	Reagenzien; Volumina; Transfektion mit MP-100
Tab. 19:	Reagenzien; Volumina; Immunfluoreszenz GFP
Tab. 20:	Reagenzien; Volumina; PCR auf hAR
Tab. 21:	Proteinextraktion aus 93RS2, 93RshAR18 und 93RshAR36
Tab. 22:	Reagenzien; Volumina; Proteinmessung
Tab. 23:	Volumina, Protokoll Probenvorbereitung Western Blot
Tab. 24:	Reagenzien; Volumina; Protokoll Gelelektrophorese
Tab. 25:	Reagenzien; Volumina; Transfer der aufgetrennten Proteine

Tab. 26:	Protokoll Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
Tab. 27:	Protokoll Inkubation mit Primärantikörper
Tab. 28:	Protokoll Inkubation mit Sekundärantikörper
Tab. 29:	Protokoll Inkubation mit Peroxidase
Tab. 30:	Protokoll Farbreaktion
Tab. 31:	Reagenzien, Volumina, Protokoll PAGE-PCR
Tab. 32:	Reagenzien, Volumina, Polyacrylamidgel
Tab. 33:	Reagenzien, Volumina, Protokoll PCR Housekeeperplatte
Tab. 34:	Reagenzien, Volumina, Protokoll Real-time quantitative PCR
Tab. 35:	Reagenzien, Volumina, Probenvorbereitung für ELISA
Tab. 36:	Protokoll ELISA

1. Einleitung und Ziele

Bei der Ausprägung des männlichen Phänotyps, sowie für die Initiation und den vollständigen Ablauf der Spermatogenese, spielen die Sexualhormone Testosteron (T) und 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) eine entscheidende Rolle (Weinbauer u. Nieschlag 1998). Im männlichen Reproduktionstrakt werden deren biologische Wirkungen über den Androgenrezeptor (AR) vermittelt. Dieser wird in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Zellen exprimiert. Im Hoden in den Sertoli-Zellen, den peritubulären-Zellen und den Leydig-Zellen (Chang et al. 1988; Lubahn et al. 1988; Tilley et al. 1989; Regadera et al. 2001), nicht aber in den Keimzellen. Die Wirkung von Androgenen auf die Keimzellen wird über die Sertoli Zellen vermittelt (benannt nach dem italienischen Physiologen und Histologen Enrico Sertoli). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass Spermatogenesedefekte immer mit einer gestörten Differenzierung dieser Zellen (Bruning et al. 1993; Steger et al. 1999) assoziiert sind.

Die Expression des AR in den Sertoli Zellen selber und die Untersuchung seiner androgenvermittelnden Wirkung auf nachgeschaltete, für die Spermatogenese wichtiger Gene, ist daher von großem Interesse. Der AR gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und repräsentiert einen liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor (Collins et al. 2003). Der Wirkmechanismus der Steroidhormonrezeptoren besteht aus mehreren Teilschritten. Zunächst muss die Bindung des entsprechenden Liganden, im Fall des AR, von Testosteron oder 5 α -Dihydrotestosteron, erfolgen. Dies führt zu verschiedenen Modifikationen in der Struktur des AR (Coffey et al. 2012), etwa einer Phosphorylierung oder Acetylierung. Der entstandene AR-Komplex disloziert dann in den Zellkern und bindet dort an spezifische Bereiche der DNA, den androgen responsive elements (AREs). Über eine Aktivierung oder Hemmung weiterer Co-Faktoren des AR wird dann die Expression nachgeschalteter, AR abhängiger, Gene reguliert. Nach neueren Vorstellungen befinden sich allerdings die ungebundenen, also freien Rezeptoren im Zellkern, wo dann die Ligandbindung stattfindet.

Das für den AR codierende Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und umfasst 8 Exone unterschiedlicher Länge (Tsai u. O'Malley, 1994).

Das Exon 1 des AR-Gens weist eine polymorphe Trinukleotidsequenz auf. Diese wird CAG-Repeat genannt und codiert für einen Glutaminstrang. Die physiologische Variabilität in der Länge dieses CAG-Repeats beträgt etwa 21 ± 2 (Quigley et al. 1995), mit einer Spanne je nach Autor, zwischen 11 und 31 (La Sprada et al. 1991) bzw. 9 und 36 (Andrew et al. 1997).

Die Anzahl der hintereinanderliegenden CAG scheint wiederum eine wichtige Rolle bei der Regulation der transkriptionalen Aktivität des AR zu spielen (Sleddens et al. 1992; Gao et al. 1996). Repetitive Sequenzen wie das CAG-Repeat zeigen bei der Replikation der DNA allerdings eine erhöhte Anfälligkeit für „Lesefehler“ der DNA-Polymerasen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass es zu großen Abweichungen in diesem Bereich, auch außerhalb der physiologischen Spanne, kommen kann. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der CAG-Repeat Länge außerhalb der physiologischen Spanne mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert sind, wie der sogenannten Kennedy's Disease, einer neuromuskulär degenerativen Erkrankung (La Sprada et al. 1991, Choong et al. 1996), der Huntington-Disease, einer degenerativen Erkrankung des zentralen Nervensystems (Zühlke et al. 1993), sowie dem Androgen Insensitivity Syndrom (Gottlieb et al. 1999). Es stellt sich die Frage, inwieweit die CAG-Repeat Länge die Funktionalität des AR als Transkriptionsfaktor beeinflusst oder beeinflussen kann? Ob bei einer unterschiedlichen CAG-Repeat Länge des AR, innerhalb der physiologischen Spanne, eine reduzierte Transaktivierungsfunktion in Bezug auf nachgeschaltete Gene zeigt? Im Umkehrschluss könnte eine reduzierte Transaktivierungsfunktion in Bezug auf die Testosteronsensitivität des AR Einfluss auf den Ablauf der Spermatogenese und damit auf die Fruchtbarkeit des Mannes haben.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst **a)** zwei humane AR Klone mit verschiedenen CAG-Repeat-Längen innerhalb der physiologischen Varianz zu generieren. In einem zweiten Schritt **b)** sollen zwei Sertoli-Zellsysteme entwickelt werden, in denen die CAG-Repeat-Länge des in der jeweiligen Zelllinie exprimierten AR bekannt ist, um Stimulationsversuche vergleichbar durchführen zu können. Die AR-Varianten sollen dafür in immortalisierte Ratten-Sertoli-Zellen ohne eigenen AR, stabil transfiziert und die neuen Sertoli Zelllinien anschließend charakterisiert werden.

In einem dritten Schritt **c)** soll exemplarisch ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen CAG-Repeat-Längen in den Zelllinien auf die Regulation eines

nachgeschalteten Gens mittels Testosteronstimulation untersucht werden. Als direkt vom AR reguliertes Gen wurde Clusterin (SGP-2) ausgewählt, da es eines der am längsten bekannten, sowie ein deutlich in Sertoli- und epidydimalen Zellen von Ratte und Mensch exprimiertes Gen ist (Collard et al. 1987, Sylvester et al. 1991). Die Expression von Clusterin und auch vom AR sollen nach der Stimulation mit unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen auf mRNA-Ebene, die des Clusterin zusätzlich auf Proteinebene gemessen werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Entwicklung, Histologie des Hodens

Die Funktion des Hodens besteht im Wesentlichen aus der Bildung der männlichen Keimzellen und der männlichen Geschlechtshormone.

Erste Anzeichen zur Differenzierung des Hodens zeigen sich in der Embryonalentwicklung über die Bildung der frühen Keimstränge und der Tunica albuginea. Die Septula testis und das Mediastinum testis entstehen ebenfalls aus mesenchymalen Anteilen der frühen Keimstränge. Aus den Keimsträngen entwickeln sich auch die Tubuli seminiferi. Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen entwickeln sich aus den Blastemzellen der Tubuli seminiferi, die Spermatogonien aus Primordialkeimzellen.

Das Rete testis differenziert sich aus Strängen ohne Keimzellen und vereint sich mit den Ductuli efferentes, die ihrerseits aus den Urnierenkanälchen hervorgegangen sind. Das Keimdrüsenepithel schließlich entsteht aus dem Oberflächenepithel der Keimdrüsenanlage und wird zum Mesothel des serösen Hodenüberzuges (Schnorr u. Kressin 2001).

Im histologischen Aufbau besteht der Hoden aus dem Hodenparenchym im Inneren und einer dieses umgebenden bindegewebigen Kapsel (König, Liebig 2002).

Zu den bindegewebigen Anteilen des Hodens zählen die Bindegewebskapsel (Tunica albuginea), die Bindegewebssepten (Septula testis) und der Bindegewebskörper (Mediastinum testis).

Das Hodenparenchym beinhaltet die Tubuli seminiferi contorti, die Tubuli seminiferi recti, sowie das Rete testis mit den Ductuli efferentes. Eine detaillierte Übersicht des histologischen Hodenaufbaus kann bei Mayerhofer et al. (2005) entnommen werden.

2.2. Zellpopulationen des Hodens

Die funktionellen Zellen des Hodens sind Sertoli-Zellen, Keimzellen, Leydig-Zellen und peritubuläre Myoidzellen. Lediglich die Sertoli- und die Keimzellen befinden sich im Keimepithel.

2.2.1 Sertoli-Zellen

Im Keimepithel treten bei allen Säugetieren neben den Keimzellen auch andere somatische Zellen auf, die als „Ammenzellen“ oder „Stützzellen“ beschrieben werden. Die gebräuchlichste Bezeichnung ist jedoch die nach dem Erstbeschreiber Enrico Sertoli (1842 – 1910), Sertoli-Zellen (Sertoli 1865).

Die Sertoli-Zellen sind hochprismatische Zellen die der Basalmembran des Keimepithels aufsitzen, wobei sie sich lumenwärts pyramidenförmig verjüngen. Sie sind zwischen den sich differenzierenden Keimzellen angeordnet und stehen mit diesen in funktionellem und auch strukturellem Kontakt (Liebig 2003). Die Zellkerne der Sertoli-Zellen sind dreieckig bis oval, meist aber eher unregelmäßig geformt und zeigen einen prominenten Nukleolus. Die Anzahl der Sertoli-Zellen ist bereits mit Eintreten der Pubertät festgelegt und nimmt im Alter ab, was neben anderen Faktoren eine reduzierte Fruchtbarkeit im Alter bedingen soll (Sharpe et al. 2003). Die Sertoli-Zellen übernehmen im Keimepithel eine Vielzahl wichtiger Aufgaben, so dass eine physiologisch ablaufende Spermatogenese ohne diese nicht möglich ist (Griswold 1998). Als sogenannte „Stütz-/Ammenzellen“ behalten die Sertoli-Zellen während der gesamten Spermatogenese den Kontakt mit den Keimzellen, dadurch wird eine mechanische Stabilität in der Tubuluswand und der transzelluläre Stoffaustausch zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen ermöglicht. Zwischen einzelnen Sertoli-Zellen bestehen im basolateralen Zellbereich Verbindungen der Plasmamembranen, die sogenannten *tight junctions* (Griswold 1998). Diese Verbindungen stellen eine Barriere zwischen zirkulierendem Blut und Lymphe auf der einen und dem Inneren des Keimtubulus auf der anderen Seite da. Diese sogenannte Blut-Hoden-Schranke wurde beim Menschen (Bergmann et al. 1989) und bereits einige Jahre früher bei der Ratte (Dym et al. 1970) beschrieben. Sie dient dem Schutz der Keimzellen vor Angriffen durch das körpereigene Immunsystem. Neben anderen phagozytotisch aktiven Zellen

wie Makrophagen, sind auch Sertoli-Zellen in der Lage etwa degenerierte Keimzellen zu phagozytieren (Nakanishi et al. 2004).

Sertoli-Zellen sezernieren differenzierungsabhängig eine ganze Reihe von Proteinen. Diese dienen wie beispielweise das fetal exprimierte Cytokeratin 18 zur Zytoskelettformierung. Das Anti-Müller-Hormon (*AMH*) wird in den Sertoli-Zellen des embryonalen Hodens gebildet und bewirkt die Rückbildung der Müller'schen Gänge, was entscheidend für die männliche Geschlechtsentwicklung ist. Das ab der Pubertät exprimierte androgen binding protein (*ABP*) ist ein Transportprotein und das ebenfalls ab der Pubertät exprimierte Connexin 43 (*Cx43*) gehört zu den Transmembranproteinen und ist durch die Bildung von gap junctions für die Zell zu Zell-Interaktion von großer Bedeutung. Als direktes Zielgen des Androgenrezeptors sind Clusterin oder Rhox zu nennen (Wang et al. 2006).

2.2.2. Keimzellen

Im Keimepithel befinden sich außer den Sertoli-Zellen noch die Keimzellen. Diese liegen in einem Tubulusquerschnitt in unterschiedlichen Entwicklungsstadien vor (Clermont 1963). Aus einer basal liegenden Spermatogonie, mit einem eher kugeligen, chromatinreichen Zellkern, entstehen durch eine mitotische Teilung eine A- und eine B-Spermatogonie. Die A-Spermatogonie dient als Reservezelle und teilt sich später wieder in eine A- und B-Spermatogonie. Die B-Spermatogonie teilt sich mitotisch und wird zur primären Spermatozyte, mit einem großen, strukturierten Zellkern. Diese tritt dann in die erste meiotische Reifeteilung ein. Die postmeiotischen runden Spermatiden haben einen runden, dunklen Zellkern und wenig Zytoplasma. Elongierte Spermatiden weisen einen eher länglichen Kern auf und erinnern morphologisch schon an „reife“ Spermien. Bei den fertigen Spermien zeigt der Spermischwanz lumenwärts, der abgeflachte Kern sitzt apikal im Keimepithel. Die Spermien weisen einen haploiden Chromosomensatz auf und werden an das Tubuluslumen abgegeben. Über peristaltische Bewegungen der Tubuluswand gelangen die Spermien schließlich in den Nebenhoden, wo sie gespeichert werden (Übersicht bei Mayerhofer et al. 2005).

2.2.3. Peritubuläre Myoidzellen

Diese Zellen liegen als kontraktile Fibrozyten (Myofibroblasten) in der Tubuluswand. Sie ermöglichen den Transport der ins Lumen des Keimtubulus abgegebenen Spermien durch peristaltische Kontraktion der Tubuluswand (Übersicht bei Mayerhofer et al. 2005).

2.2.4. Leydig-Zellen

Zwischen den Hodenkanälchen, im interstitiellen Bindegewebe liegen zusammen mit Blut-, Nerven- und Lymphgefäßen, sowie vereinzelt Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, die meist in Gruppen angeordneten Leydig-Zellen. Sie werden auch Leydig'sche Zwischenzellen genannt und sind nach dem Erstbeschreiber, dem Anatom Franz von Leydig (1821-1908) benannt. Die Hauptaufgabe der Leydig-Zellen ist die Testosteronsynthese (Weinbauer et al. 2010). Neben Testosteron werden noch weitere Hormone, zumeist Peptide, synthetisiert, die aber eher autokrine oder parakrine Funktion haben.

Die erste Generation der Leydig-Zellen differenziert sich aus Blastemzellen, die nicht an der Bildung der Hodenkanälchen beteiligt sind. Diese trägt mit der Synthese von Testosteron zur Ausbildung der männlichen Geschlechtsorgane bei (Schnorr u. Kressin 2001). Prinzipiell unterscheidet man zwischen fetalen und adulten Leydig-Zellen, die trotz biochemischer und auch morphologischer Unterschiede beide der Synthese von Testosteron dienen (Svechnikov et al. 2010). Morphologisch sind die Zellen unregelmäßig polygonal geformt, mit einem runden euchromatinreichen Zellkern. Die Leydig-Zellen zeigen einen hohen Gehalt an glattem endoplasmatischem Retikulum, sowie zahlreiche Mitochondrien, was bereits Hinweise auf eine endokrine Funktion gibt (Kühnel 2002). Durch das luteinisierende Hormon (LH) der Hypophyse werden die adulten Leydig-Zellen zur Synthese von Testosteron angeregt, diese wird wiederum über einen negativen Rückkopplungsmechanismus mit der Hypophyse reguliert. In den fetalen Leydig-Zellen erfolgt die Synthese von Testosteron ohne negativen Rückkopplungsmechanismus, da beim Menschen diese bereits etwa ab der 6. Schwangerschaftswoche beginnt und zu diesem Zeitpunkt noch keine Hypophyse ausgebildet ist (O'Shaughnessy et al. 2006).

2.3. Spermatogenese

2.3.1. Ablauf der Spermatogenese

Als Spermatogenese bezeichnet man den Prozess, in dem sich aus den Stammzellen, den Spermatogonien, durch Zellproliferations- und Differenzierungsvorgänge reife Spermien entwickeln (Bergmann u. Kliesch 2010).

Die reifen Spermien entstehen in drei Entwicklungsphasen:

1. Mitotische Teilung der Spermatogonien
2. Meiotische Reifeteilung der Spermatozyten
3. Differenzierung zu reifen Spermien (Spermiogenese)

Die Spermatogonien werden in A- und B-Spermatogonien unterteilt, wobei erstere lebenslang mitotisch aktiv sind und als eine Art „Zellpool“ dienen. Ein Teil der A-Spermatogonien differenziert sich schließlich zur B-Spermatogonie. Zu diesem Zeitpunkt sind die Spermatogonien analog zu allen anderen Körperzellen diploid, mit einem doppelten Chromosomensatz ausgestattet ($2n$ $2C$). Die B-Spermatogonie tritt in die erste meiotische Reifeteilung ein. Der Chromosomensatz verdoppelt sich, ($2n$ $4C$) und es entstehen zwei identische Chromatiden, die als primäre Spermatozyten bezeichnet werden. Nach Durchlaufen der ersten meiotischen Reifeteilung entstehen haploide sekundäre Spermatozyten, mit doppeltem Chromosomensatz ($1n$ $2C$). Aus den zwei sekundären Spermatozyten entstehen in der zweiten Reifeteilung vier runde Spermatiden mit einem einfachen Chromosomensatz. ($1n$ $1C$), siehe Abb.1. Die weitere morphologische Differenzierung dieser haploiden Spermatiden zu reifen elongierten Spermien wird Spermiogenese genannt.

2.3.2. Spermiogenese

Die Spermiogenese ist ein Prozess, in dem die Spermatiden in eine kompaktere „Transportform“ umgebaut werden. Diese weitreichenden Umbauprozesse umfassen die Kondensation des Zellkerns, die Ausbildung der Geißel und die Abstoßung eines großen Teils des Zytoplasmas.

Unterteilt wird die Spermiogenese klassisch in vier Phasen: a) Golgi-Phase; b) Kappenphase; c) Akrosomale-Phase und d) Reifungsphase (Schnorr u. Kressin 2001), wobei die Ausbildung der einzelnen Phasen nicht zeitlich getrennt, sondern überlappend abläuft. In der sogenannten *Golgi-Phase* entstehen aus im Golgi-Apparat gebildeten Vesikeln ein einziges akrosomales Bläschen und eine cranio-caudale Symmetrie. Das akrosomale Bläschen heftet sich am zukünftigen Vorderende an die Kernmembran. Am Gegenpol wird durch ein Zentriol die Bildung der Geißel induziert.

Die *Kappenphase* ist durch die Umbildung des akrosomalen Bläschens zu einer den Kern zu etwa fünfzig Prozent umfassenden Akrosomenkappe gekennzeichnet.

Die Anlage für die Geißel am distalen Pol verlängert sich, Organellen und Zytoplasma beginnen sich nach distal des Spermatidenkerns zu verlagern. Der Zellkern wird in der anschließenden *akrosomalen Phase* abgeflacht und das Chromatin erfährt eine Kondensation. Die Kondensation des Chromatins führt zur Sistierung der Transkription und es erfolgt ein Austausch von Kernproteinen. Die Histone werden durch Protamine ersetzt. Dieser Austausch wird in Bezug auf den Reifegrad der Spermatiden und den Zeitpunkt des Austausches als essentiell für eine physiologische Spermienreifung angesehen (Steger et al. 2000). Es kommt zur endgültigen Differenzierung des Akrosoms, die Spermatide hat jetzt eine längliche Form und das gesamte Zytoplasma ist in den distalen Teil der Zelle verlagert. Das Zytoplasma umgibt den proximalen Teil der inzwischen gut ausgebildeten Geißel und dort lagern sich zahlreiche Mitochondrien an (Schnorr u. Kressin 2001).

In der *Reifungsphase* ist die Kondensation des Zellkerns abgeschlossen, der Schlußring wird nach distal verlagert, das Akrosom bedeckt etwa zu zwei Dritteln den Zellkern, die Manschette ist zurückgebildet. Es entsteht die endgültige Struktur des Spermiums mit Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz. Der größte Teil des Zytoplasmas wird abgeschnürt und von Sertoli-Zellen phagozytiert. Dieser abgeschnürte Teil des Zytoplasmas wird als Residualkörper bezeichnet, durch seine Abschnürung wird es erst möglich, die Spermien in das Tubuluslumen zu entlassen. Vom Tubuluslumen gelangen die noch unbeweglichen Spermien durch peristaltische Kontraktionen der Tubuluswand in den Nebenhodenkopf und erlangen dort über Sekrete ihre Beweglichkeit. Gespeichert werden sie dann vorwiegend im Nebenhodenschwanz (Mayerhofer et al. 2005; Schnorr u. Kressin 2001).

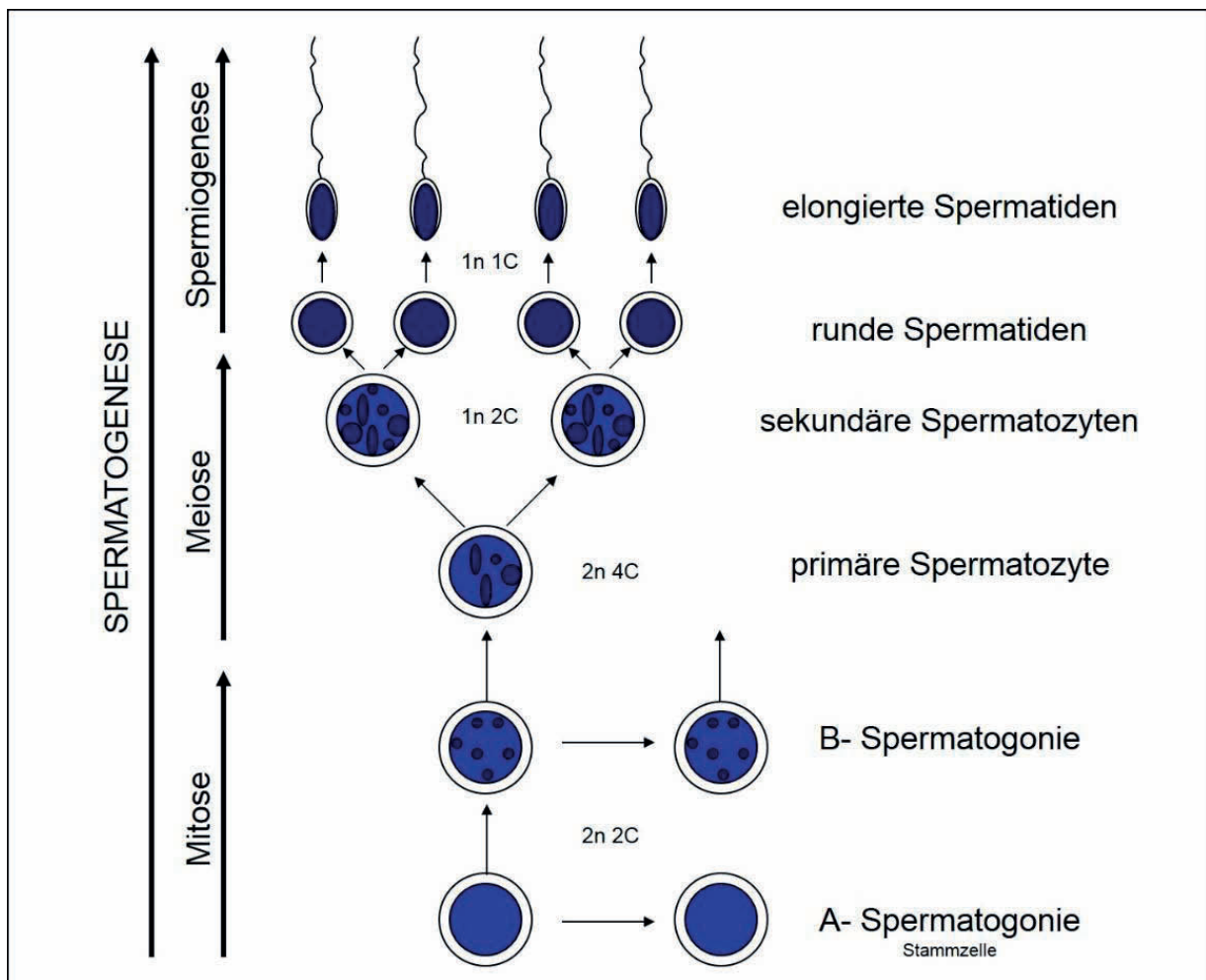


Abb. 1: Schema der Spermatogenese im menschl. Keimepithel (modifiziert nach Bergmann 2005).

2.3.3. Kinetik der Spermatogenese

Ein besonderes Merkmal der Spermatogenese ist die zeitliche Synchronisation des Spermatogenesezyklus. Die Mitose der Spermatogonien und die Meiose der Spermatozyten finden in einer synchronen Differenzierung statt. Durch diese zeitgleich stattfindende Entwicklung jeweils einer Zellpopulation, die zeitlich etwas versetzt stattfindet, entstehen die verschiedenen charakteristischen Zellbilder. Die Entwicklungen der einzelnen Zellpopulationen folgen wellenartig aufeinander und werden als Spermatogenesewelle bezeichnet (Bergmann 2005).

Die Spermatogenese wird nach dem Auftreten bestimmter Zellen im Keimtubulus in verschiedene Stadien unterteilt, wobei bezüglich der Anzahl der benannten Stadien deutliche Speziesunterschiede bestehen. So teilt man etwa die Spermatogenese der

Ratte in 19 Stadien (Clermont, Leblond 1952) und die des Menschen in 6 Stadien ein (Clermont 1963).

Die Stadien werden von I bis VI nummeriert:

Stadium I: es liegen sowohl runde als auch elongierte Spermien vor, was für Stadium I als charakteristisch eingestuft wird, außerdem finden sich pachytäne Spermatozyten, A- und B-Spermatogonien.

Stadium II: Stadium II ist charakterisiert durch das Vorkommen nahezu fertiger Spermien, da die elongierten Spermien ihren Residualkörper abschnüren. Es finden sich auch pachytäne Spermatozyten, sowie A- und B-Spermatogonien.

Stadium III: am Ende von Stadium II findet die Freisetzung der reifen Spermatiden statt, deshalb zeigt sich in Stadium III nur eine Art von Spermatiden. Es finden sich pachytäne Spermatozyten, praeleptotäne Spermatozyten und A-Spermatogonien im Keimepithel.

Stadium IV: die runden Spermatiden befinden sich in der Streckungsphase des Kerns (Elongation), pachytäne und leptotäne Spermatozyten, sowie A-Spermatogonien im Bereich der Basalmembran kommen ebenfalls vor.

Stadium V: in Stadium V zeigen sich elongierte Spermatiden, pachytäne und zygotäne Spermatozyten, sowie A-Spermatogonien. Die Spermatozyten treten in die 1. Reifeteilung der Meiose ein.

Stadium VI: gekennzeichnet ist Stadium VI durch das Auftreten von sekundären Spermatozyten, da sich aber an die erste Reifeteilung der Meiose unmittelbar die zweite Reifeteilung und damit die Entwicklung zu runden Spermatiden anschließt, ist dieses Stadium in der Histologie wohl eher selten zu identifizieren (Bergmann u. Kliesch 2010).

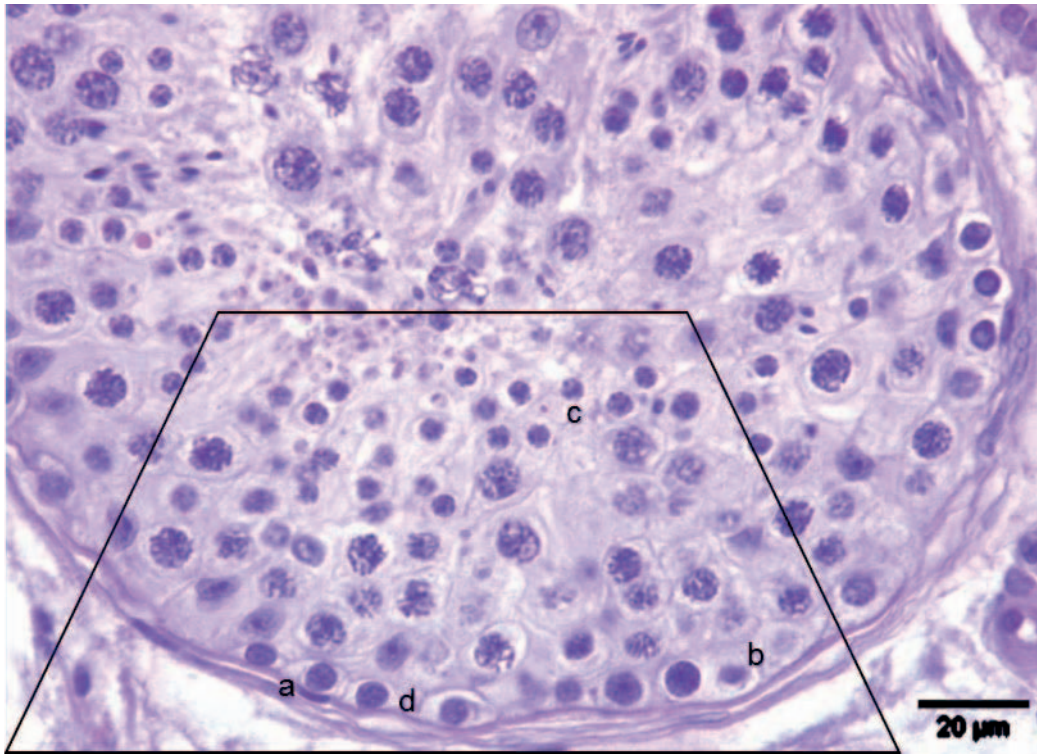


Abb. 2: Ausschnitt: Normale Spermatogenese Stadium III (Paraffin, HE, x40).

a Spermatogonie **b** primäre pachytäne Spermatozyte **c** runde Spermatide **d** Sertoli-Zelle

2.3.4. Störungen der Spermatogenese

Unter Störungen der Spermatogenese lassen sich verschiedene Phänomene innerhalb des Keimtubulus zusammenfassen, die alle zu herabgesetzter oder kompletter Unfruchtbarkeit führen.

Histologisch werden eine a) Hypospermatogenese, nur vereinzelte, aber vollständig entwickelte Keimzellen, b) Spermatogeneseearreste, auf den Stufen von runden Spermatiden, primären Spermatozyten oder Spermatogonien, ein c) Sertoli-Cell-Only-Syndrom, keine Keimzellen im Keimtubulus oder ein d) Tubulusschatten, ein Keimtubulus ohne Zellen beschrieben. Pathologische Veränderungen treten auch durch Differenzierungsstörungen der Spermatiden auf, so können durch eine Spermiogenesestörung Spermatiden mit mehreren Zellkernen vorkommen (Bergmann 2005). Störungen der Spermatogenese sind aber stets korreliert mit einer unvollständigen Differenzierung der Sertolizellen etwa im Bereich des Zellkerns, da wiederum die Entwicklung der Keimzellen von diesen abhängig ist (Bruning et al. 1993). Treten in benachbarten Keimtubuli unterschiedliche Defekte auf, spricht man von einer sogenannten „bunten Atrophie“ (Sigg 1979).

2.3.5. Regulation der Spermatogenese

Die Regulation der Spermatogenese erfolgt über einen speziellen Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse.

Diese Regulation erfolgt über das in den Leydig-Zellen produzierte Testosteron, über die aus dem Hypophysenvorderlappen stammenden Hormone luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH), sowie über Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) aus dem Hypothalamus.

Die Freisetzung von GnRH bewirkt zunächst eine FSH- und LH-Ausschüttung ins Blut. Im Hoden wird dann durch FSH die Aktivität der Sertoli-Zellen gesteuert und durch LH die Testosteronbildung der Leydig-Zellen angeregt. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus bewirkt ein hoher Testosteronspiegel wiederum die Hemmung der Freisetzung von GnRH im Hypothalamus und damit die Ausschüttung von FSH und LH in der Hypophyse (Steger 2001).

FSH wirkt in den Sertoli-Zellen über den FSH-Rezeptor und stimuliert die Bildung von Androgen-Binding-Protein (ABP). Dieses dient dem Transport von Testosteron in die Sertoli-Zellen. Dort wird dessen Wirkung dann über den AR, der als nuklärer Transkriptionsfaktor fungiert, vermittelt.

Die Sertoli-Zellen produzieren außerdem die Peptidhormone Activin und Inhibin, die einen zweiten Rückkopplungsmechanismus innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse darstellen. So hemmt Inhibin die FSH Freisetzung und Activin führt zu einer vermehrten Ausschüttung von FSH (Nieschlag et al. 2009).

2.4. Regulation der Genexpression über Transkriptionsfaktoren

Die Transkription erfolgt in eukaryoten Zellen über drei unterschiedliche RNA-Polymerasen, die jeweils unterschiedliche Gene transkribieren. Damit eine effektive Transkription abläuft, bedarf es der Regulation über sogenannte Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an eine spezifische Sequenz in der Promotorregion von Genen binden und dadurch die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerasen aktivieren oder hemmen. Transkriptionsfaktoren lassen sich in drei Gruppen einteilen: a) generelle Transkriptionsfaktoren; b) genspezifische Transkriptionsfaktoren, wobei hier zwischen b1) nicht-regulierten und b2) induzierbaren unterteilt wird. Alle Transkriptionsfaktoren weisen sowohl eine Aktivierungsdomäne als auch eine DNA-Bindungsdomäne auf, je nach Art des Transkriptionsfaktors können aber noch weitere Sekundärstrukturen, Motive genannt, hinzukommen. Zu diesen Motiven zählt man das Zink-Finger-Motiv, das Helix-Turn-Helix-Motiv oder das Helix-Loop-Helix-Motiv, deren Name jeweils von der besonderen Sekundärstruktur abgeleitet ist (Latchman 1998).

Die Steroidhormonrezeptoren werden zu den induzierbaren Transkriptionsfaktoren gezählt. Alle Steroidhormonrezeptoren besitzen eine hormon-spezifische Bindungsdomäne. Bindet dort das für die Aktivierung entscheidende spezifische Hormon, führt das zu einer Konformationsänderung. Es entsteht ein Steroidrezeptor-Hormon-Komplex, der in den Zellkern gelangt und dort analog zu den anderen Transkriptionsfaktoren an das Hormon-Response-Element bindet. Dadurch wird die vom Promotor kontrollierte Transkription aktiviert oder gehemmt (von Berg 2001).

2.5. Der Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren und zur Unterfamilie 3 den Östrogenrezeptoren. Die in Gruppe C zusammengefassten Steroidhormonrezeptoren sind: Glucocorticoid-, Mineralocorticoid-, Progesteron- und Androgenrezeptor (Germain et al. 2006). Der Androgenrezeptor wird sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte in fast allen Geweben exprimiert (Germann 2002; Pelletier 2000), im Hoden in den Sertoli-, den Leydig- und den peritubulären Myoidzellen (Chang et al. 1988; Tilley et al. 1989; Regadera et al. 2001), nicht aber in den Keimzellen. Einige Autoren beschreiben eine Expression zwar auch in den

Keimzellen (Lubahn et al. 1989, Kimura et al. 1993), diese scheint aber nur Stadien-spezifisch zu sein. Speziell in den Sertoli-Zellen zeigt die immunhistologische Färbung des AR während der Spermatogenese ebenfalls eine stadienabhängig höhere oder niedrigere Expression. Dies konnte sowohl bei der Ratte (Vornberger et al. 1994) als auch beim Menschen (Suarez-Quian et al. 1999) gezeigt werden.

Das AR-Gen liegt auf dem X-Chromosom, genauer auf Xq11-12 (Brown et al. 1989) und umfasst 2750 Basenpaare (GenBank Accession Number NM_000044.2). Es codiert für ein Protein mit einem Molokulargewicht von 110 kDa und 918 Aminosäuren (AS). Der AR umfasst acht Exone (Chang et al. 1988) von unterschiedlicher Länge und setzt sich aus folgenden unterschiedlichen Bereichen, oder auch Domänen, zusammen: auf Exon 1 befindet sich eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AS 1-537), auf Exon 2 und 3 eine DNA-Bindungsdomäne mit zwei Zinkfinger-Motiven, auf Exon 4 eine Art Scharnierdomäne, Hinge-domain (AS 538-625) genannt und Exon 5-8 stellen die Ligand-Bindungsdomäne (AS 626-918) dar (Lubahn et al. 1988; Chang et al. 1998).

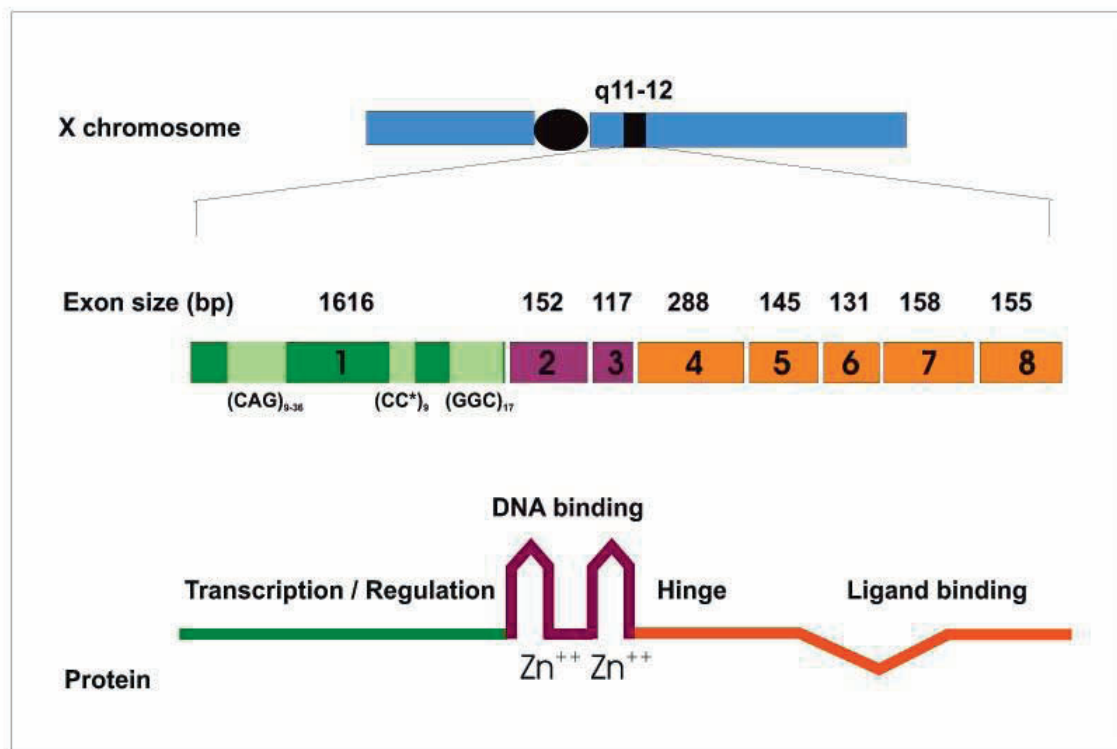


Abb. 3: Aufbau des AR (modifiziert nach Gelmann 2002).

Auf Exon 1 des AR-Gens gibt es eine polymorphe Anzahl der Aminosäuren Abfolge CAG (Cytosin – Adenosin – Guanin). Diese Abfolge der Basen CAG, *CAG-Repeat* genannt, codiert für die Aminosäure Glutamin und endet mit dem Basentriplett CAA. Die Länge dieses Glutaminstranges ist variabel, wobei die physiologische Länge 21 ± 2 CAG beträgt (Quigley et al. 1995), mit einer Spanne je nach Autor, zwischen 11 und 31 (La Sprada et al. 1991) bzw. 9 und 36 (Andrew et al. 1997). Die Varianz in der Länge des CAG-Repeat scheint zusätzlich vom ethnischen Hintergrund abhängig zu sein, so scheint der kaukasische Typus eine durchschnittlich geringere CAG-Repeat Länge zu haben als der chinesische Typus (Mifsud et al. 2001).

Der AR fungiert, wie auch die anderen intranukleären Rezeptoren, als Transkriptionsfaktor (Germann 2002). Diese Rezeptoren liegen in inaktiver Form im Zytoplasma an Proteine gebunden vor und wandern nach Bindung des jeweiligen Liganden in den Zellkern. Dadurch erfolgt die hormonabhängige Signaltransduktion in der Zelle, siehe Abb. 4.

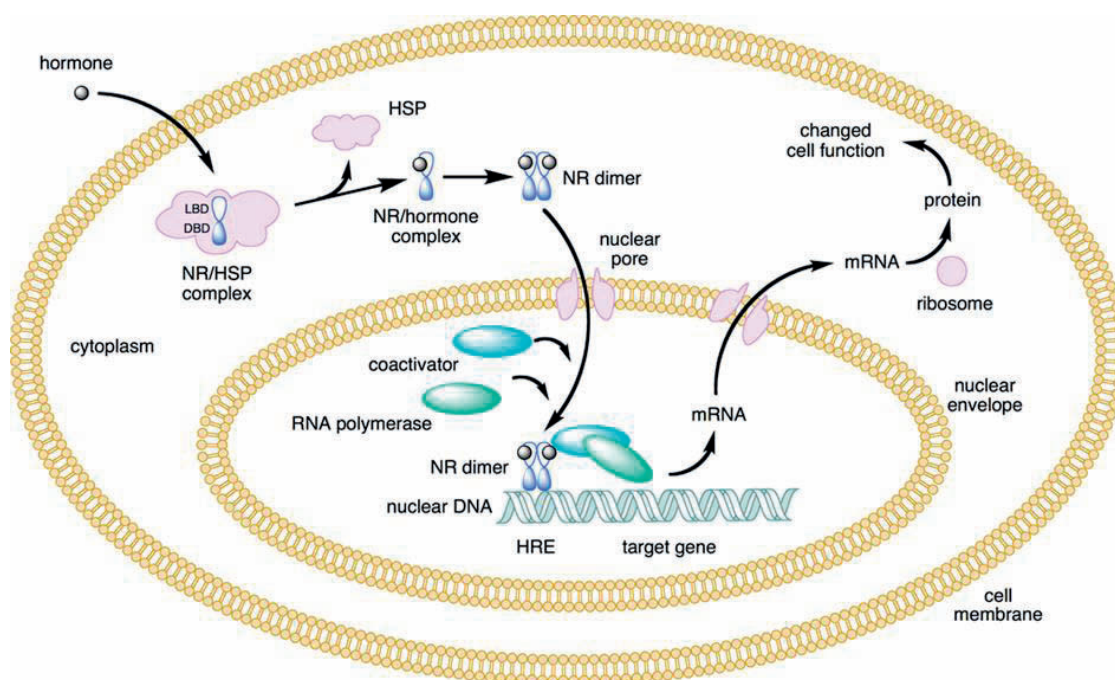


Abb.4: „Nuclear receptor action“ von Boghog2 - Lizenziert unter Gemeinfrei über Wikimedia.

Die als Transkriptionsfaktor fungierenden Rezeptoren besitzen, wie bereits erwähnt, zumeist mehrere Transaktivierungsfunktionen mit unterschiedlicher Lokalisation und Bedeutung. Die für die Wirkung des AR entscheidende Transaktivierungsfunktion befindet sich auf der N-terminalen Aktivierungsdomäne, genannt AF-1. Bei anderen

Steroidhormonrezeptoren befinden sich die relevanten Transaktivierungsfunktionen dagegen eher auf der Liganden abhängigen Bindungsdomäne (McEwan 2004).

Damit der AR als Transkriptionsfaktor funktioniert, ist die Bindung von Co-Faktoren, wie etwa p160, der an AF-1 bindet, von großer Bedeutung, da sie dessen Wirkung verstärken (Irvine et al. 2000). Es werden in der Literatur auch Co-Repressoren wie CR1-interacting-factor 1 beschrieben. In Prostata-Zellen konnte gezeigt werden, dass es bei einer Down-Regulation dieses Co-Repressors zu einem Anstieg der AR-Transaktivierung und des mRNA-Levels des AR-Zielgens Prostata-spezifisches-Antigen (PSA) kommt (Suh et al. 2008).

Weitere Transaktivierungsfunktionen von untergeordneter Bedeutung des AR sind AF-2 und AF-5. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass AF-1 konstitutionell aktiv ist, wohingegen AF-2 hormonabhängig ist.

Die Bedeutung der Co-Faktoren für die Transkriptionsaktivität des AR konnte gezeigt werden, da eine Hemmung dieser Co-Faktoren durch bestimmte Inhibitoren zu einer deutlich geringeren Transkriptionsaktivität des AR führte (Sadar 2011).

Zunächst liegt der AR in inaktiver Form, wie auch die anderen Steroidhormonrezeptoren, im Zytoplasma gebunden an Proteine, sogenannte Heat-Shock-Proteine (hsp) vor. Bindet einer der Liganden Testosteron oder Dihydrotestosteron, erfolgt eine Konformationsänderung und die Ablösung der hsp. Der entstandene Hormon-Rezeptor-Komplex gelangt in den Zellkern und bindet als Hormon-Rezeptor-Dimere über Zinkfinger an ARE's (Bennett et al. 2010), was die Expression AR-abhängiger Zielgene aktiviert oder hemmt (Lee et al. 2003). Die Rekrutierung von Co-Faktoren erfolgt bei der Bildung von Transkriptionskomplexen. Die Expression AR-abhängiger Zielgene, wie Rhox 2, 5 und 10, die für die Differenzierung der Sertoli-Zellen wichtig sind (Maclean et al. 2005), oder Clusterin, das als Marker für die Zellreifung gilt (Plotton et al. 2005), wird über diese Aktivierung oder Hemmung reguliert. Der AR vermittelt die Wirkung der Androgene von den Sertoli-Zellen auf die Keimzellen. Er ist für die Reifung der Sertoli-Zellen, sowie die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke und damit dem Ablauf einer normalen und vollständigen Spermatogenese von entscheidender Bedeutung (Wang et al. 2006).

2.6. Das CAG-Repeat

Die variierende Länge des CAG-Repeats auf Exon 1 des AR wird im Zusammenhang mit gestörter, unvollständiger oder gar ausbleibender Spermatogenese (Tut et al. 1997; von Eckardstein et al. 2001) und der Ausbildung von sogenannten Basentriplett-Erkrankungen, der Kennedy-Disease (LaSprada et al. 1991; Choong et al. 1996), der Huntington-Disease (Gusella und McDonald 1995) und dem Androgen Insensitivity Syndrom (Rajender et al. 2007) gesehen.

Bei der Huntington-Disease, einer neurodegenerativen Erkrankung des zentralen Nervensystems, ist das CAG-Repeat meist leicht verlängert (Zühlke et al. 1993), bei der Kennedy-Disease die erstmals 1968 als spinal-bulbäre Muskelatrophie (SBMA) beschrieben wurde, ist das CAG-Repeat auf über 40 Repeats verlängert. Die extreme Verlängerung des CAG-Repeat bei der Kennedy-Disease führt neben den neuromuskulären Degenerationen auch zu Hodenatrophie und Infertilität. Es wurde von LaSprada et al. (1991) erstmals ein Zusammenhang zwischen einem Gendefekt auf dem AR-Gen, der zu einer CAG-Repeat Verlängerung führt, und einer damit verbundenen Infertilität hergestellt. Sowohl die physiologische Varianz als auch die Grenzwerte der CAG-Repeat Länge werden von den Autoren unterschiedlich angegeben, wobei das physiologische Mittel bei etwa 21 ± 2 (Quigley et al. 1995) liegt. Ob ein Zusammenhang einer herabgesetzten Fertilität mit einer abweichenden CAG-Repeat-Länge innerhalb der physiologischen Varianz von etwa 9–36 (Andrew et al. 1997) besteht oder nicht, wurde in diversen Studien bearbeitet. Eine Korrelation zwischen einer Veränderung (Zunahme oder Abnahme) der CAG-Repeat-Länge innerhalb der physiologischen Varianz und einer herabgesetzten Spermatogenese, einer daraus resultierenden Infertilität und oder einer verminderten Transaktivierung des AR, wird von einigen Autoren bestätigt (Tut et al. 1997; Dowsing et al. 1999; Yoshida et al. 1999; von Eckardstein et al. 2001; Mifsud et al. 2001; Claessens et al. 2005), von anderen (Dazde et al. 2000; Rajpert-De Meyets et al. 2002; Lund et al. 2003; Westerveld 2008; Badran et al. 2009; Neonen et al. 2010) nicht. Nach einer Meta-Analyse, die 33 Studien zum möglichen Zusammenhang der Verlängerung des CAG-Repeat und der Fertilität des Mannes verglichen hat (Davis-Dao et al. 2007), scheint es eine leicht positive Korrelation zu geben. Ab welcher CAG-Repeat-Länge ein erhöhtes Risiko für eine Infertilität besteht und wie hoch dieses ist, wird kontrovers diskutiert. Mifsud et al. (2001) sehen 26 oder mehr CAG-Repeats als mit einem erhöhten Risiko für die männliche Infertilität durch eine Azoospermie korreliert an. Es

konnte in einer klinischen Studie an eugonaden, fertilen Männern gezeigt werden, dass die Länge des CAG-Repeat die Androgen-Sensitivität in verschiedenen Geweben beeinflusst (Zitzmann 2009). Eine extreme Verlängerung des CAG-Repeat führt zur Ausbildung von Krankheitsbildern wie der SBMA.

Ob allerdings ein AR mit einem definierten, kürzeren oder längeren CAG-Repeat innerhalb der als physiologisch angesehenen Längenvarianz, eine bessere oder schlechtere Androgen-Sensitivität und damit eine veränderte Transaktivierung zur Folge hat, ist nach wie vor nicht geklärt.

Es scheinen für die Funktion des AR als Transkriptionsfaktor neben der reinen Länge des CAG-Repeats auch andere Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. So führt bereits der Austausch einer einzelnen Base im CAG-Repeat, von Glutamin durch Arginin, zu einer Veränderung in der dreidimensionalen Struktur der Transaktivierungsdomäne des AR (Hose et al. 2009). Verändert sich die Länge des CAG-Repeat, muss dies ebenfalls mit einer Veränderung in der dreidimensionalen Struktur einhergehen. Diese Veränderung in der Struktur kann wiederum zu einer herabgesetzten Transaktivierungsfunktion des AR (Tut et al. 1997) und damit geringerer Expression nachgeschalteter Gene führen. Irvine et al. (2000) zeigten in einer Studie mögliche Effekte eines verlängerten CAG-Repeat auf die über den Co-Faktor p160 vermittelte Transaktivierung des AR auf.

Aber nicht nur der bereits erwähnte Basenaustausch kann zu strukturellen Veränderungen führen. Es ist seit langem bekannt, dass repetitive Trinucleotidsequenzen generell leicht zu Lesefehlern der DNA-Polymerasen führen können (Pearson und Sinden 1998; Richards und Sutherland 1994). Verstärkt wird dies noch durch starke Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen den Aminosäuren Guanin und Cytosin bestehen. Auf DNA-Ebene kommt es durch diese Anziehungskräfte zur Bildung von *hairpins* und *loops*, die ein fehlerfreies Ablesen der DNA durch die Polymerasen erschweren oder verhindern (Yu et al. 1995; Shimizu et al. 1996). In *Escherichia coli* zeigten Bowater et al. (1996) durch Transfektion von Plasmiden einen Zusammenhang zwischen der Länge der transfizierten repetitiven Sequenzen CTG und CAG und dem Zellzyklus, sprich dem Wachstum der Zellen. Des Weiteren gibt es die Vermutung, dass diese Beobachtungen in Bakterienzellen auch auf die eukaryote Zelle in vivo übertragbar seien (Samadashwilly et al. 1997).

Es ist davon auszugehen, dass neben der eigentlichen Länge des CAG-Repeat und der korrekten Abfolge der Aminosäuren auch die Lage des CAG-Repeat auf der Transaktivierungsdomäne einen Einfluss auf die Aktivität des AR hat. Die N-terminale Region, in der das CAG-Repeat auf dem AR-Gen liegt, ist als genetisch wenig konserviert und damit leicht veränderlich (Germann et al. 2002) beschrieben. Mutationen sind bei repetitiven Sequenzen wie dem CAG-Repeat nicht selten. So sind speziell beim AR über 200 Mutationen bekannt, von denen einige im Bereich der Transaktivierungsdomäne auf Exon 1 liegen (Gottlieb 1999) und dadurch zu einer herabgesetzten Aktivität des AR als Transkriptionsfaktor (Quigley et al. 1995; Wang et al. 1998; Davis-Dao et al. 2007) führen.

Zeigt der AR eine herabgesetzte Aktivität, kann es zum Androgeninsensitivsyndrom (AIS) kommen. Dieses Syndrom zeigt sich in verschiedenen Abstufungen, von einer lediglich bestehenden Infertilität über die Ausbildung einer weiblichen Brust, fehlender oder geringer Schambehaarung bis hin zur Ausbildung weiblicher Genitalien (Gottlieb et al. 1999; Rajender et al. 2007). Andere Autoren machen für die Ausbildung des AIS nicht die Länge des CAG-Repeat und die damit potentiell herabgesetzte Aktivität des AR verantwortlich, sondern einen erhöhten Östrogenspiegel. Um die herabgesetzte Rezeptoraktivität des AR abzufangen, sei zunächst ein erhöhter Testosteronspiegel nötig. Da der Östrogenspiegel aber in gleichem Maße ansteige wie der Testosteronspiegel, komme es in der Folge zu den bei AIS beschriebenen phänotypischen Veränderungen hin zum Weiblichen (Huhtaniemi et al. 2009). In wie weit die Länge des CAG-Repeat alleine die testosteronabhängige Funktion des AR als Transkriptionsfaktor und damit die Expression nachgeschalteter Gene beeinflusst, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt.

2.7. Androgennabhängige Gene

In Bezug auf die Differenzierung von Sertoli-Zellen werden in der Literatur unter anderem Cx43 (Brehm et al. 2011) und die Rhox-Gene 2, 5 und 10 (Maclean et al. 2005) als androgenabhängige Gene genannt. Die Rhox-Gene etwa werden in fast alle reproduktiven Geweben wie dem Hoden, dem Nebenhoden, und den Ovarien exprimiert. Weitere androgenabhängige Proteine sind das Transportprotein *ABP* (Skinner et al. 1989) welches als Marker für die Sertolizelldifferenzierung angesehen wird und das über den AR regulierte Clusterin (SGP-2; Apolipoprotein J).

Es erhielt seinen Namen weil es die Bildung eines Clusters unter Sertoli-Zellen hervorrufen kann (Blaschuk et al. 1983; Fritz et al. 1983). Clusterin ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa. Sowohl bei der Ratte, der Maus, als auch beim Menschen besteht die mRNA aus 9 Exonen mit einer Länge zwischen 45 und 412 Basenpaaren (Jordan-Starck et al. 1994; Rosemblyt u. Chan 1994; Jones u. Jomary 2002). Clusterin wird in den meisten physiologischen Flüssigkeiten wie Blutplasma, Cerebrospinalflüssigkeit, im Urin und in der Samenflüssigkeit gefunden (Aronow et al. 1993). In den meisten Organen kann es ebenfalls nachgewiesen werden. Es konnte bei der Ratte gezeigt werden, dass sich auch nach einer Orchiektomie die messbaren Clusterin-Konzentrationen in Leber und Serum nicht ändern. Woraufhin die Autoren schlossen, dass Clusterin als Marker für androgenabhängige Prozesse im männlichen Reproduktionstrakt dienen kann (Grima et al. 1990, Aronow et al. 1993;).

Die in einem Review von Rosenberg und Silkensen (1995) zusammengefassten physiologischen Funktionen zeigen analog zur Expression in diversen Geweben eine große Bandbreite, die vom Lipidtransport über die Spermienreifung, die Initiation der Apoptose, der Protektion von Membranen bis hin zur Vermittlung von Zell- zu Zell - Interaktionen reicht. Im Reproduktionstrakt der männlichen Ratte ist es als das am meisten sezernierte Protein in Sertoli- und epididymalen Zellen beschrieben (Collard et al. 1987, Sylvester et al. 1991). Beim Menschen konnte Clusterin immunhistochemisch im Hoden mit normaler Spermatogenese an fünf Hauptlokalisationen nachgewiesen werden: 1.) im Zytoplasma der Sertoli-Zellen; 2.) in der noch unreifen Geißel der Spermatozoen im Keimtubulus; 3.) im Golgi-Apparat von primären Spermatocyten; 4.) in den Residualkörpern im luminalen Zytoplasma der Sertoli-Zellen und 5.) vereinzelt in den Keimzellen (Bryan et al. 1994). Die Bedeutung bei der Entstehung von Krankheiten ergibt sich nicht durch Mutationen im Gen. Bis heute ist kein Zusammenhang mit der Entstehung eines spezifischen Krankheitsbildes durch eine Genmutation bei Clusterin bekannt, sondern eher mit einer erhöhten Expression. Diese gesteigerte Expression kann zu vermehrter Apoptose, aber auch zu verringerter Zellproliferation führen. Beispiele hierfür sind etwa die Alzheimer-Krankheit (Choi-Miura u. Oda 1996) aber auch Prostata-Krebs beim Menschen (Miyake et al. 2000). Des Weiteren wird eine ursächliche Beteiligung von Clusterin bei der Glomerulonephritis, der Artherosklerose, sowie bei myokardialen Infarkten genannt (Jones u. Jomary 2001).

2.8. Zellkultur

Zellkultur bedeutet die Kultivierung pflanzlicher oder tierischer Zellen außerhalb des Organismus in einem Nährmedium, um diese näher untersuchen zu können. Die Bestrebungen eine Zellkultur anzulegen gibt es in der Naturwissenschaft schon lange. So gelang es Ross Granville Harrison bereits 1907 (zitiert nach Nicholas 1961) tierische Zellen außerhalb des Körpers wachsen zu lassen, dazu verwendete er embryonale Nervenfasern von Fröschen.

Prinzipiell unterscheidet man zwischen einer *Primärkultur* und *immortalisierten* Zelllinien. Die Zellen der Primärkultur stammen direkt aus dem Ursprungsgewebe. Die immortalisierten Zellen sind entweder Tumorzellen, oder die Unsterblichkeit wird durch molekularbiologische Veränderungen des Genoms herbeigeführt. Ziel der Immortalisierung ist es stabile Zelllinien zu erhalten, die kontinuierlich gezüchtet werden können. In der Zellkultur werden die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zellen in drei Phasen eingeteilt; Phase 1: (*lag*-Phase) repräsentiert die Primärkultur (Eigenschaften der Ausgangszelle); Phase 2: (*logarithmische* Phase) Zellen in der Kultur sind am teilungsfreudigsten; Phase 3: die Zellen durchlaufen eine Krise und stellen die Zellteilung ein (Hayflick u. Moorhead 1961). Eukaryote Zellen zeigen in Kultur einen Lebenszyklus. Dieser sogenannte Zellzyklus beschreibt den Ablauf bestimmter Ereignisse zwischen zwei Zellteilungen und wird ebenfalls in Phasen eingeteilt. Folgende Phasen werden unterschieden: *G₁-Phase*: hauptsächlich Zellwachstum; *S-Phase*: DNA-Synthese; *G₂-Phase*: Vorbereitung auf die Zellteilung; *M-Phase*: Mitose; *G₀-Phase*: Ruhephase in der die Zellen vollständig ausgereift sind und keine weitere Differenzierung durchlaufen (Schmitz 2007).

Um Versuche unter standardisierten Bedingungen durchführen zu können und um beispielsweise die Regulation bestimmter Gene untersuchen zu können, bedarf es stabiler, immortalisierter Zelllinien mit definierten Eigenschaften.

Eine der gebräuchlichsten Methoden eine Zelle zu immortalisieren, ist die Einschleusung von Fremd-DNA in die Zellen. Dies geschieht über *Transformation* oder über *Transfektion*. In der Zellkultur bedeutet Transformation zumeist das Einbringen viraler Fremd-DNA in die Zellen, etwa des Cytomegalievirus-Promotors (CMV-Promotor), aus dem humanen Herpes-5-Virus stammend. Die Virus-DNA wird dabei entweder in das Genom der Wirtszelle eingebaut, oder aber repliziert autonom. Durch den Einbau bleibt die Teilungsfähigkeit der Zellen dauerhaft erhalten. Allerdings führt

die Immortalisierung mit viraler Fremd-DNA stets zu Chromosomenaberrationen, was auch andere Eigenschaften der Zellen, etwa die Expression bestimmter Proteine, im Vergleich zu den Primärzellen verändern kann.

Bei der Transfektion werden die Primärzellen im Prinzip nach dem Vorbild der Natur dazu veranlasst, sich in Krebszellen zu verwandeln und damit sowohl unbegrenzte Teilungsfähigkeit zu erlangen als auch die Seneszenz (Zellalterung) zu umgehen. Durch Transfektion von Herpes- oder Papillomaviren steigt die Gefahr der Entstehung von Krebszellen aus den Primärzellen. Es können sich Virus-Protein-Komplexe bilden, die die Apoptose unterbinden. Es werden Protoonkogene, wie etwa c-Myc, was als Transkriptionsfaktor fungiert, überexprimiert und dadurch kann in besonderem Maße das Zellwachstum aktiviert werden. Ein weiteres Szenario, das aber noch nicht vollständig verstanden ist, ist die Aktivierung der Telomerase in den Zellen. Telomere sind DNA Abschnitte, die am Ende des Chromosoms als eine Art Schutzhaube fungieren und diese vor Degradierungen bewahren. Kommt es zum Wegfall oder zur starken Verkürzung der Telomere, geht die Zelle normalerweise zu Grunde um Chromosomenveränderungen und damit Entartungen zu verhindern. Durch die Transfektion kann dieser Punkt, an dem die Zelle aufgrund der Veränderung des Telomers zu Grunde geht, überwunden werden (Schmitz 2007).

In dieser Arbeit sollte der humane AR in Sertoli-Zellen transfiziert werden, um u.a. die Expression von Clusterin als direkt AR abhängiges Gen zu untersuchen. Es standen zu diesem Zeitpunkt vier immortalisierte Sertoli-Zelllinien zur Verfügung. Eine primäre, nicht weiter charakterisierte Zelllinie kam nicht in Frage. Zum einen standen die zwei Maus-Sertoli-Zelllinien *SK 11* (Sneddon et al. 2005, Walther et al. 1996) und *WL3* (Mueller u. Korach 2001) zum anderen standen die zwei Ratten-Sertoli-Zelllinien,

SCIT-C8 (Konrad et al. 2004) und *93RS2* (Jiang et al. 1997) zur Verfügung. Die *SK 11* Zelllinie wurde aus Zellen von 10 Tage alten H2K-tsA58 transgenen Mäusen, die einem SV40 Promotor exprimieren, kultiviert. Es konnte ein funktioneller AR, sowie Clusterin auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Sneddon et al. 2005). Zur Kultivierung der *WL3* Zellen wurden Sertoli-Zellen aus 15-19 Tage alten Mäusen gewonnen. Die Immortalisierung der Zellen wurde über eine retrovirale Infektion der Primärkultur mit den E6/E7-Genen eines humanen Papillomavirus (HPV) 16 ausgeführt (Halbert et al. 1992). Es konnte mittels PCR die Expression von Clusterin und weiterer Gene wie Vimentin, aber nicht von AR nachgewiesen werden (Mueller u. Korach 2001).

Die Sertoli-Zellen aus der Ratten-Sertoli-Zelllinie SCIT-C8 (**S**ertoli cells from *i*mature *t*estis, clone 8) stammen von 19 Tage alten Wistar-Ratten und wurden mittels eines SV40 Promotors immortalisiert. Die Autoren sprechen von einem schwachen Signal eines AR in der Hybridisierung der DNA über Southern Blot (Southern 1975) im Vergleich mit primären Sertoli-Zellen (Konrad et al. 2004). Die primären Sertoli-Zellen der 93RS2 Zelllinie wurden von 19 Tage alten Ratten gewonnen und dann ebenfalls mit einem SV40 Promotor immortalisiert (Jiang et al. 1997). Es konnten 42 Chromosomen pro Zelle, wie bei der normalen Ratte und die Expression von Clusterin nachgewiesen werden. Die Expression eines AR wurde nicht untersucht.

3. Material und Methoden

Um AR-Klone mit unterschiedlicher, definierter CAG-Repeat Länge zu bekommen, mussten diese zunächst erstellt werden.

Aus einem Ausgangsklon (kommerzieller Trueclone®-AR von OriGene im Vektor pCMV6-XL5) wurden weitere AR-Klone mit unterschiedlicher CAG-Repeat Länge erstellt und in Expressionvektoren kloniert. Die beiden anderen CAG-Repeats (CAG 14 und CAG 36) wurden aus ARs ausgeschnitten, die in der Veterinär-Anatomie ursprünglich aus Hodenbiopsien von Patienten mit normaler Spermatogenese amplifiziert und dann sequenziert wurden.

Diese Expressionsvektoren dienten später zur Transfektion in die immortalisierten Ratten-Sertoli Zellen. C-terminal an dem für die Transfektion ausgewählten Vektor befindet sich ein fluoresziierendes Protein, das nach Transfektion benutzt werden kann um den Transfektionserfolg zu kontrollieren. Die Transfektion führt dann in den Sertoli-Zellen zur Expression eines AR/GFP-Fusionsproteins.

Parallel erfolgte ein Screening geeigneter Zelllinien für die Transfektion, da die Zellen möglichst keinen eigenen AR exprimieren sollten und sich bezüglich ihrer Kultureigenschaften, d.h. Wachstumsgeschwindigkeit, Widerstandfähigkeit etc. als für den geplanten Versuch als geeignet darstellen mussten

Nach der Sequenzierung der neuen Klone in den Expressionsvektoren erfolgte die Transfektion in die ausgewählte Sertoli-Zelllinie und anschließend die Selektion über Antibiotika.

Es entstanden zwei neue Ratten-Sertoli Zelllinien, die durch RT-PCR und Western-Blot weiter charakterisiert wurden. Nach Testosteronstimulation erfolgte die Messung der Expression von AR und Clusterin über RT-qPCR, so wie die Menge an exprimiertem Clusterin (ng/ml) mit ELISA.

Zur Verdeutlichung der methodischen Vorgehensweise siehe auch Abb.5.



Abb. 5: Methodische Vorgehensweise

3.1. Klonierung humaner AR (CAG 18)

3.1.1. PCR humaner AR-Klon

Das Prinzip der PCR (Polymerasekettenreaktion) beruht auf drei wesentlichen Teilschritten: einem Denaturierungs-, einem Anlagerungs- und einem Kettenverlängerungsschritt.

Die DNA wird bei einer hohen Temperatur, zumeist 94° Celsius, denaturiert, das heißt die beiden DNA Stränge werden getrennt. Anschließend wird die Temperatur auf 55 - 60° Celsius gesenkt. Dies führt zu einer Anlagerung der vorher in massivem Überschuss zugegebenen Oligonucleotidprimer. Eine zweite Temperaturerhöhung auf etwa 72° Celsius, ermöglicht der jeweiligen Polymerase die Primer zu verlängern, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. In einem PCR-Zyklus entsteht im Prinzip von jeder eingesetzten DNA eine exakte Kopie. Wiederholt man den Zyklus, erhält man vier gleiche DNAs usw.

Amplifiziert wurde ein kommerzieller AR (Kat-Nr SC114220 im Vektor pCMV6-XL5 via NotI, AR pos. 722-4314, Trueclone®; OriGene), mit 2750bp. Die Sequenzierung ergab eine CAG-Repeat-Länge von 18 (GATC Biotech, Konstanz). Die PCR-Experimente wurden an einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Für die PCR verwendeten wir das GC-Rich PCR-System (Roche) mit den Primern AR-F-TA (5' -CAA GCT CAA GGA TGG AAG TG - 3') und AR-R-TA-OS (5'- CCA TCT ATT TCC ACA CCC AG – 3').

Die eingesetzte Menge der GC-Rich-Resolution Solution® wurde im MM1 (Mastermix) verdoppelt, der MM2 entsprach dem Standardprotokoll.

Die eingesetzten 10 Mikroliter Trueclone-Plasmid-DNA (1 ng/µl), entsprechen 10 Nanogramm DNA und durchliefen die PCR über 40 Zyklen, siehe Tabelle 1.

Reagenzien	Volumen (µl)	PCR Programm:
PCR MM1		<u>95°C 3min</u>
PCR Grade Nucl. Mix	1	95°C 30 sec
Primer F	1	52°C 30 sec } 10 Zyklen
Primer R	1	<u>72°C 2 min 15 sec</u>
DNA	10	95°C 30 sec
GC-Rich Resol. Sol.	10	52°C 30 sec } 30 Zyklen
ddH ₂ O	12	<u>72°C 2 min 15 sec +5 sec</u>
PCR MM2		72°C 7 min
ddH ₂ O	4	
5x GC-Rich reaction		
buffer with DMSO	10	
GC-Rich Enzyme Mix	1	

Gesamtvolumen	50	

Tab. 1: Reagenzien; Volumina; PCR Programm der Amplifikation des AR *Trueclone*®

3.1.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um DNA oder RNA nach ihrer Größe (d.h. nach Anzahl der Basenpaare) aufzutrennen. Dabei wandert eine Mischung aus zu trennenden Molekülen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch eine Agarosegelmembran. Kürzere DNA-Stücke wandern unter Einfluss des elektrischen Feldes schneller durch das Gel als längere. Mit Hilfe einer DNA-Ladder (DNA-Leiter), die als Marker für die Agarosegelelektrophorese dient und ein Gemisch aus verschiedenen DNA-Strängen unterschiedlicher Länge darstellt, können die Größen (Längen) der einzelnen DNA-Stücke bestimmt werden.

Die amplifizierte cDNA wird vor dem Auftragen auf das Agarosegel noch mit einem sogenannten Lade-Puffer (loading dye), vermischt. Das im Lade-Puffer enthaltene Glycerin dient zur Beschwerung der cDNA, um diese in den Geltaschen zu halten und ein Herausdiffundieren in den TAE-Puffer zu verhindern.

Mit 1x TAE-Puffer wurde ein 1%iges Agarose-Gel gegossen (1 g Agarose (Roti®Garose, Roth) in 100 ml TAE Puffer gelöst), in die Gelkammer eingesetzt, mit 1x TAE-Laufpuffer überschichtet und für 60 min bei 100 V durchgeführt. Als Ladder diente eine Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas), siehe Tabelle 2.

Reagenzien	Volumen (µl)
PCR Product	10
Loading Dye	2
ddH ₂ O	8

Gesamtvolumen	20

Tab. 2: Agarosegelelektrophorese der Amplifikation des AR *Trueclone*®

3.1.2.1. Detektion

Zur Detektion der cDNA des hAR-True-clones® nach erfolgter Elektrophorese, wurde das Gel für 30 min unter Schütteln mit Ethidiumbromid (Roth) gefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mit dem UV-Transluminator (ImageMaster).

3.1.3. TA-Klonierung des humanen AR

Klonierung bedeutet im molekularbiologischen Sinne eine identische Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes durch Einbringen in einen Vektor. Die für die Klonierung benutzten Vektoren bestanden aus einer ringförmigen Plasmid-DNA und waren bakteriellen Ursprungs. Plasmide sind doppelsträngige, zirkuläre DNA Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in der Bakterienzelle vermehren können. Deshalb wurden die PCR Produkte in Plasmidvektoren kloniert. Sie dienen als Vehikel für die DNA-Fragmente und können molekularbiologisch weitreichend verändert werden. Es werden u.a. virale Promotoren, Antibiotikaresistenzgene und diverse Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen etc. einkloniert. Die erste, für diese Studie durchgeführte Klonierung beruhte auf dem Prinzip der TA-Klonierung, wobei TA für Thymidin/Adenosin steht. Das Prinzip nutzt die Entdeckung, dass Polymerasen wie die Taq-Polymerase meist einen Überhang der Base Adenosin produzieren (Hu 1993).

Benutzt man für die Klonierung einen Vektor mit Thymidin-Überhang, lassen sich DNA-Fragmente mit Adenosin-Überhang in diesen besser einklonieren als in einen Vektor mit glatten Enden. Die Primer für die TA Klonierung müssen entsprechend gewählt werden, da die Base am 5'-Ende Einfluss auf die Art des Überhangs hat. Die Literatur

empfiehlt ein Adenosin oder Guanosin für das 5'-Ende des Primers (Marchuck et al. 1991).

Der zweite für die Klonierungen ausgewählte Vektor war ein sogenannter TOPO-Vektor von Invitrogen. Die Klonierung funktioniert im Prinzip gleich. Statt einer Ligase wird hier eine aktivierte Topoisomerase 1 verwendet. Die Topoisomerase erkennt eine spezifische Schnittstelle auf der DNA, schneidet dort und bleibt weiter gebunden. Dadurch sind beide DNA-Enden von der Topoisomerase weiterhin blockiert und eine Selbstligation wird verhindert (Shumann 1994).

Die Eigenschaften der verwendeten Vektoren wurden auf die spätere Verwendung der fertigen Klone abgestimmt. Für diese Art der Klonierung wird das PCR-Produkt (DNA-Fragment) mit dem Vektor, einer Salzlösung und Wasser inkubiert. Danach wird die Lösung auf chemisch kompetente Bakterienzellen, zumeist *E. coli*, gegeben. Durch eine weitere Inkubation auf Eis sollen sich Plasmidvektor und PCR-Produkt verbinden. Über einen Hitzeschock von 42°Celsius für 30 Sekunden führt man eine Permeabilität der Bakterienzellwand herbei und schleust so die Plasmide in die Zelle. Nach Zugabe einer Bakteriennährlösung (S.O.C.-Medium = Super Optimal Broth + Glucose) werden diese für eine Stunde bei 37°Celsius inkubiert und dann auf speziellen Nährmediumplatten ausgestrichen. Diese Platten enthalten eines der Antibiotika, für dessen Resistenzgen der jeweilige Vektor kodiert. Ist das PCR Produkt in den Vektor eingebaut, können die genetischen Informationen u.a. für die Antibiotikaresistenz abgelesen werden und dieses Plasmid kann auf den Nährmediumplatten mit Antibiotika wachsen. Ist die Schnittstelle nicht, wie oben beschrieben, von einer TOPO-Isomerase blockiert, kommen auch Selbstligationen vor, d.h. der Vektor schließt sich ohne ein PCR-Produkt eingebaut zu haben.

Entscheidend für die weitere Verwendung eines generierten Klons ist daher zu überprüfen, ob überhaupt ein PCR-Produkt eingebaut wurde und wenn ja, ob dieses PCR Produkt in der richtigen Leserichtung von 5' nach 3', eingebaut wurde. Um die Klone dahingehend zu überprüfen, führt man einen Restriktionsverdau durch und trägt die erhaltenen Fragmente auf ein Agarosegel auf. Da die Größen der Fragmente für die jeweilige Einbaurichtungen und den leeren Vektors unterschiedlich sind, ist über Restriktionsverdau eine Selektion möglich.

Der humane AR wurde in zwei Expressionsvektoren mit Hilfe von chemisch kompetenten *E. coli* (TopTen) kloniert. Zum einen in den pcDNA 6.2 C-EmGFP Vektor

(Invitrogen) und zum anderen in den pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA Vektor (Invitrogen), diese Daten werden nicht gezeigt, da die Klone dieses Expressionsvektors für die weiteren Versuche keine Rolle mehr spielten. Der pcDNA 6.2 C-EmGFP Vektor hingegen sollte später dazu dienen, in den transfizierten Sertolizellen optisch den Transfektionserfolg über das exprimierte GFP (grün fluoreszierendes Protein) kontrollieren zu können.

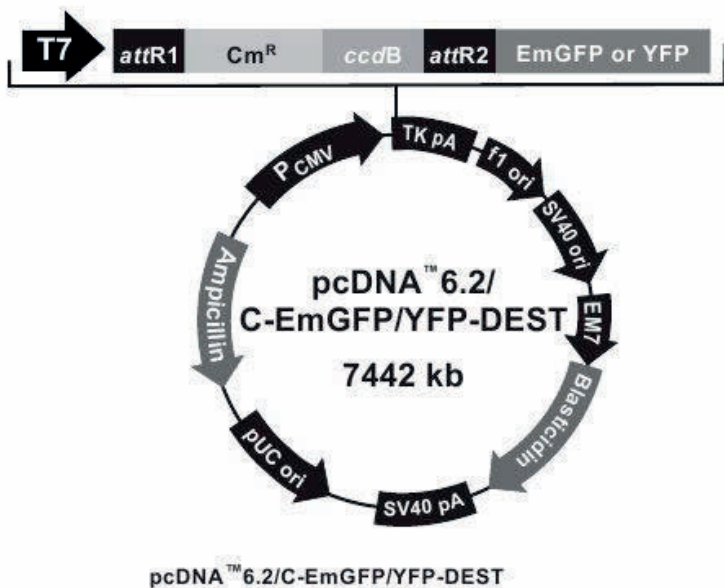


Abb. 6: Vektorkarte Expressionsvektor

Nach etwa 16 Stunden Inkubation bei 37° Celsius werden die Kolonien begutachtet und einzelne Kolonien von der Platte „gepickt“, um diese in flüssigem Nährmedium über Nacht zu vermehren. Aus dieser Bakterienkultur kann dann die Plasmid-DNA des generierten Klones präpariert werden.

Das Ausplattieren der Klone erfolgte auf LB Platten (LB = lysogeny broth), diese wurden nach folgendem Rezept hergestellt: Hefeextrakt (5 g/l), Tryptone (10 g/l), Natriumchlorid (10 g/l) Agar (12,5 g/l) + 1 Liter dH₂O wurden. Zugestzt wurde das Antibiotikum Ampicillin. Das noch flüssige Medium wird auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und anschließend in Zellkulturschalen verteilt; Protokoll TA Klonierung siehe Tabelle 3.

Klonierung pcDNA 6.2 C-EmGFP und pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA

Reagenzien	Volumen (µl)	
PCR Produkt	1	
Salt Solution	1	<i>Ansatz für beide Vektoren</i>
steril water	3	
Vektor	1	

Gesamtvolumen	6	

Protokoll TA Klonierung

- 20 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 2 µl des Ansatzes auf die E. coli (TopTen) Zellen geben
- 30 min auf Eis stehen lassen
- für 30 sec bei 42° Celsius inkubieren (heat shock)
- sofort wieder auf Eis stellen
- 250 µl SOC Medium zugeben
- für 60 min bei 37° Celsius im Schüttler inkubieren
- jeden Vektoransatz auf 3 LB-Amp-Platten ausplattieren (50 µl, 100 µl, ca. 110 µl Vektoransatz)
- über Nacht im Brutschrank bei 37° Celsius inkubieren
- gewachsene Kolonien beurteilen und „picken“
- jede Kolonie einzeln in 2 ml LB-Amp-Medium geben
- über Nacht im Schüttler bei 37° Celsius inkubieren
- Mini-Präparation

Tab. 3: Reagenzien; Volumina; Protokoll der TA Klonierung in *pcDNA 6.2 C-EmGFP und pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA*.

3.1.4. DNA Mini-Präparation humaner AR-Klone

Die Plasmid-DNA Präparation beruht zumeist auf der so genannten Alkalischen Lyse (Good et al 1997). Weitere Methoden wären die „Boilling Method“ und die Lithium-Minipräparation die weniger Arbeitsschritte verlangen, aber keine DNA von hoher Reinheit liefern. In den kommerziell erhältlichen „Kits“, erfolgt die Mini-Präparation

ohne Chloroform-Phenol Reinigung und Alkoholfällung. Im ersten Schritt wird die Bakterienkultur zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet resuspendiert man anschließend mit einem Lysispuffer, was zu einer Zelllyse führt. Danach wird das Lysat geklärt und die freigewordene Plasmid-DNA an eine Silicamembran gebunden. In weiteren Schritten werden genomische DNA und Proteine ausgefällt. Abschließend wäscht man die Plasmid-DNA mit Alkohol und nimmt das entstandene Pellet in H₂O oder Puffer auf.

Die Mini Präparation erfolgte mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) mit leicht modifiziertem Protokoll durch. Jeweils zwei Milliliter Bakterienkultur wurden für drei Minuten bei 8000g. zentrifugiert, um ein Bakterienpellet zu erhalten. Die weitere Präparation erfolgte nach Protokoll in Tab. 4:

- Bakterienpellet in 250 µl Resuspensionspuffer (P1) aufnehmen
- 250 µl Lysispuffer (P2) zugeben und 6-mal invertieren (5 min lysieren)
- 350 µl Puffer (N3) zugeben und 6-mal invertieren
- zentrifugieren für 10 min bei 16000 g
- Überstand in eine Säule mit Silicamembran überführen
- 60 sec zentrifugieren und Durchfluß verwerfen
- Waschen der Säule mit 0,5 ml Puffer PB
- 60 sec zentrifugieren und Durchfluß verwerfen
- Waschen der Säule mit 0,75 ml Puffer PE
- 60 sec zentrifugieren und Durchfluß verwerfen
- noch 3-mal zentrifugieren, um restlichen Puffer PE zu entfernen
- 50 µl Puffer EB zugeben, um DNA zu lösen, (1 min stehen lassen, dann 1 min zentrifugieren)

Tab. 4: Protokoll Mini-Präparation

Eine Messung der Plasmid-DNA Menge erfolgte mit einem Photometer (Eppendorf). Fünf Mikroliter der Plasmid-DNA wurden dafür in 195 Mikroliter H₂O aufgenommen und gegen H₂O gemessen.

3.1.5. Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen erkennen auf der DNA eine Sequenz von vier, sechs oder auch acht Basen, die zumeist auf beiden Strängen gleich

ist. Mit dem entsprechenden Puffer schneiden die Enzyme nur an dieser Erkennungsstelle. Diese kommt allerdings je nach Sequenz der zu verdauenden DNA auch mehrfach vor. Bei einem einfachen Verdau mit Restriktionsenzymen pipettiert man H₂O, DNA, Enzym plus entsprechenden Puffer zusammen und inkubiert bei 37°Celsius für eine Stunde. Da die Schnittstelle/Schnittstellen bekannt ist/sind, kann man die Größe der entstehenden DNA-Fragmente errechnen und das Ergebnis auf einem Agarosegel visualisieren. Durch den Kontrollverdau der Klone konnten Vektoren, die keinen humanen AR aufgenommen hatten, sowie diejenigen mit falscher Einbaurichtung aussortiert werden. Falsche Einbaurichtung bedeutete in diesem Fall, dass das PCR-Produkt und somit die Sequenzinformation nicht in 5' 3'-Richtung, sondern in 3' 5'-Richtung eingebaut ist. Damit ist kein korrektes Ablesen möglich.

Die Schnittkarten für die beiden Vektoren pcDNA 6.2 C-EmGFP und pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA wurden anhand der DNA Sequenz erstellt. Der pcDNA 6.2 C-EmGFP Vektor wurde mit dem Enzym Pvu1 (Fast Digest, Fermentas) geschnitten. Im leeren Vektor ergäbe das Schnittbild zwei Banden, 4308bp (bp= Basenpaare) und 2213bp. In reverser Einbaurichtung drei Banden 6057bp, 2214bp, 4309bp und in korrekter 5'-3' Richtung drei Banden von 4309bp, 8346bp und 2214bp. Der Vektor pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA wurde mit dem Enzym EcoR1 (Fast Digest, Fermentas) geschnitten. Da dieser Vektor ein TOPO Vektor ist, was eine Selbstligation verhindert, musste nur auf die korrekte Einbaurichtung hin überprüft werden. In reverser Einbaurichtung ergäben sich zwei Banden von 4507bp und 3358bp und in korrekter 5'-3' Richtung ebenfalls zwei Banden von 1283bp und 6582bp. Reagenzien und Volumina für den Kontrollverdau siehe Tabelle 5.

Reagenzien	Volumen (µl)
Puffer	4
ddH ₂ O	33,5 <i>Ansatz für PVU1 und EcoR1</i>
Enzym	0,5
DNA	2

Gesamtvolumen	40

Tab. 5: Reagenzien; Volumina; Kontrollverdau ARCAG18 in *pcDNA 6.2 C-EmGFP* und *pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA*.

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37° Celsius inkubiert und danach auf ein 1 prozentiges Agarosegel (2g Agarose in 200ml TAE Puffer gelöst) mit 4 Mikroliter Loading Dye gemischt und komplett aufgetragen. Nach einer Laufzeit von eineinhalb Stunden bei 140 Millivolt erfolgten eine Färbung mit Ethidiumbromid und die visuelle Auswertung.

3.1.6. Sequenzierung

Um die genaue Nucleotidsequenz der klonierten humanen Androgenrezeptoren zu ermitteln, ließen wir eine Sequenzierung (GATC, Biotech) durchführen. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Sequenz des „Ausgangsklones“ und der DNA-Sequenzdatenbank vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) verglichen.

3.2 Klonierung humane AR CAG 36 und CAG 14

3.2.1. Sequenzierung

Nach einer Sequenzierung (GATC Biotech) konnten die CAG-Repeat-Längen der neuen AR cDNAs (AR/Q36 und AR/Q14) überprüft und bestätigt werden. Diese Klone stammen aus dem eigenen Labor der Veterinär-Anatomie und wurden aus Hodenhomogenat von Patienten mit normaler Spermatogenese amplifiziert.

3.2.2. Restriktionsdoppelverdau

Das Prinzip des Doppelverdaues unterscheidet sich von oben beschriebenem einfachen Verdau lediglich durch den Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen in einem Ansatz. Zuvor mussten die Sequenzen der beiden neuen ARs (AR/Q36 und AR/Q14) und der schon kreierte Klon im Expressionsvektor *pcDNA 6.2 C-EmGFP* auf die für die weiteren Klonierungen erforderlichen Schnittstellen hin überprüft werden. Es sollte nicht der gesamte AR kloniert werden, sondern nur zwei unterschiedliche Längenvariationen des CAG-Repeats. Diese wurden dann mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten.

Jeweils 1 Mikrogramm cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen Ehe1 und Eco911 (Fast Digest, Fermentas) verdaut, siehe Tabelle 6 und 7.

Doppelverdau AR CAG 18 in pcDNA 6.2 C-EmGFP

Reagenzien	Volumen (µl)
Puffer	5
Ehe1	1
Eco911	1
ddH ₂ O	40,5
DNA (0,388 µg/µl)	2,5

Gesamtvolumen	50

Doppelverdau AR/Q36 in pcDNA 6.2 C-EmGFP

Reagenzien	Volumen (µl)
Puffer	5
Ehe1	1
Eco911	1
ddH ₂ O	35
DNA (0,1278 µg/µl)	8

Gesamtvolumen	50

Tab. 6: Reagenzien; Volumina; Restriktionsdoppelverdau AR CAG 18 und 36 in *pcDNA 6.2 C-EmGFP*.

Doppelverdau AR/Q14

Reagenzien	Volumen (µl)
Puffer	5
Ehe1	1
Eco911	1
ddH ₂ O	32
DNA (0,0949 µg/µl)	11

Gesamtvolumen	50

Tab. 7: Reagenzien; Volumina; Restriktionsdoppelverdau AR CAG 14 in *pcDNA 6.2 C-EmGFP*.

Die gesamten Doppelverdauansätze wurden mit 5 Mikroliter Loading Dye gemischt, auf ein 1 prozentiges präparatives Agarosegel aufgetragen und anschließend für 10 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.2.3. Extraktion der AR cDNAs aus Agarosegel

Eine Gelextraktion wird zur Trennung von "gewünschter" DNA und "ungewünschter" DNA eingesetzt. Über diese Methode konnten die „gewünschten“ Fragmente des Restriktionsdoppelverdaus isoliert und in weiteren Schritten aufgereinigt werden. Da die DNA unter UV-Licht sehr schnell zerfällt, wurden die vorher errechneten Bandengrößen zuerst nur durch einen Schnitt markiert. Nach dem Ausschneiden ohne UV-Licht überführten wurden die DNA-Fragmente anschließend in zuvor ausgewogene Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Durch eine Wägung der Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Gelstücken konnte so die Masse der Gelstücke bestimmt und zur weiteren Aufreinigung das QIAEX II (QIAGEN) verwendet werden. Protokoll siehe Tabelle 8.

- ausgeschnittenes Fragment in Puffer QX1 aufnehmen (1 Teil Gel in 3 Teile Puffer)
- resuspendieren des Gelstücks für 30 sec (vortexen)
- Puffer QX2 zugeben (30 µl für 2-10 µg DNA)
- bei 50° Celsius für 10 min inkubieren (alle 2 min vortexen; Farbe muss gelb sein)
- 30 sec zentrifugieren und Überstand abnehmen
- Pellet waschen mit Puffer QX1 (vortexen)
- 2 x waschen mit Puffer PE (dazwischen 30 sec zentrifugieren und Überstand abnehmen)
- Pellet 10 – 15 min lufttrocknen (wird weiß)
- DNA in 20 µl H₂O lösen

Tab. 8: Reagenzien; Volumina; *Gelextraktion QIAEX II*

3.2.4. Ligation

Eine Ligation ist eine Verknüpfung von zwei freien DNA Enden, katalysiert durch das Enzym Ligase (Sgamaella, 1970). Die Verknüpfung entsteht zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxy-Ende der DNA-Fragmente über eine Phosphodiesterbindung. Durch Katalyse einer T4 Ligase (Fermentas) konnten die beiden zuvor herausgeschnittenen AR cDNA-Fragmente mit den CAG-Repeat-Längen CAG 14 und CAG 36 mit dem pcDNA 6.2 C-EmGFP Vektor verbunden werden. Die Inkubation jedes DNA-Fragments (CAG14 und CAG36) erfolgte sowohl in einem fünffachen als auch in einem zweifachen Volumenüberschuss des Inserts gegenüber der Ligase für zwei Stunden bei 18° Celsius, siehe Tabelle 9.

<i>Protokoll Ligation (2-fach Ansatz)</i>		<i>Protokoll Ligation (5-fach Ansatz)</i>	
Reagenzien	Volumen (µl)	Reagenzien	Volumen (µl)
Insert	2	Insert	5
Vektor	1	Vektor	1
Puffer (von T4 Lig.)	2	Puffer (von T4 Lig.)	2
ddH ₂ O	14	ddH ₂ O	11
T4 Ligase	1	T4 Ligase	1
	----		----
Gesamtvolumen	20	Gesamtvolumen	20

Tab. 9: Reagenzien; Volumina; Ligation AR cDNA-Fragmente mit *pcDNA 6.2 C-EmGFP*.

Ein Mikroliter jedes Ligationsansatzes wurde dann zur Transformation auf die chemisch kompetenten E.coli gegeben und weiter nach folgendem Protokoll in Tabelle 10 vorgegangen.

- 1 µl Ligationsansatz auf 50 µl chem. kompetente E. coli
- 30 min auf Eis
- für 30 sec bei 42° Celsius inkubieren (heat shock)
- sofort wieder auf Eis stellen
- 250 µl SOC Medium zugeben
- für 60 min bei 37° Celsius im Schüttler inkubieren
- jeden Vektoransatz auf 3 LB-Amp-Platten ausplattieren (50 µl, 100 µl, ca. 110 µl Zellsuspension)
- über Nacht im Brutschrank bei 37° Celsius inkubieren

weitere Arbeitsschritte dieses Protokolls am nächsten Morgen:

- gewachsene Kolonien beurteilen und „picken“
- jede Kolonie einzeln in 2 Milliliter LB-Amp-Medium geben
- über Nacht im Schüttler bei 37° Celsius inkubieren
- Mini-Präparation

Tab. 10 : Transformation der Ligationsansätze mit chemisch kompetenten E. Coli.

3.2.5. DNA Mini-Präparation

Nach der Inkubation über Nacht erfolgte eine Plasmid-DNA Mini-Präparation nach *gleichem Protokoll wie in 3.1.4. beschrieben.*

3.2.6. Kontrollverdau

Der anschließende Kontrollverdau der neuen Klone wurde nach in 3.1.5. beschriebenem Protokoll durchgeführt. Da die CAG-Repeat-Längen 14 und 36 in den pcDNA 6.2 C-EmGFP Vektor kloniert wurden, wurde mit dem Enzym PVU1 verdaut.

3.2.7. Sequenzierung

Eine Sequenzierung (GATC, Biotech) der beiden neuen Klone, AR CAG14 und AR CAG36 im Expressionsvektor pcDNA 6.2 C-EmGFP erfolgte im Anschluss.

3.3. Auswahl geeigneter Zelllinien für die Transfektion

Zur Auswahl einer für die Klonierung und die Stimulationsversuche geeigneten Sertoli Zelllinie wurde zunächst die Expression des Ratten- bzw. Mausandrogenrezeptors (mAR, rAR) in vier verschiedenen Sertoli-Zelllinien; in WL3 (Mueller u. Korach 2001), SK-11 (Sneddon et al. 2005, Walther et al. 1996), beides Maus-Sertoli-Zelllinien, SCIT-C8 (Konrad et al. 2005), und 93RS2 (Jiang et al. 1997), beides Ratten-Sertoli-Zelllinien, untersucht

3.3.1. RNA Isolierung aus Sertoli Zelllinien

Die RNA-Isolation aus den vier Zelllinien erfolgte mit dem peqGold Total RNA Kit (Peqlab) nach folgendem Protokoll in Tabelle 11

- Zellkulturmedium abnehmen
- 2x mit PBS waschen
- 10 ml Trypsin auf die Zellen geben/ 5 min bei 34°C inkubieren
- 10 ml Zellkulturmedium zugeben (Inaktivierung Trypsin)
- 1 ml Zellsuspension entnehmen
- im Zentrifugenröhrchen 1min mit 14000g zentrifugieren/ Überstand verwerfen
- Pellet in 400 µl Lysis-Puffer resuspendieren
- auf die graue Säule geben
- 3 min mit 14000g zentrifugieren
- Durchfluss mit gl. Vol. 70%igem Ethanol mischen (vortexen)
- auf die rote Säule geben
- 1 min mit 10000g zentrifugieren/ Durchfluss verwerfen
- 500µl Waschpuffer 1 zugeben
- 15 sec mit 10000g zentrifugieren/ Durchfluss verwerfen
- 600 µl Waschpuffer 2 zugeben
- 15 sec mit 10000g zentrifugieren/ Durchfluss verwerfen
- Säule für 2 min bei 10000g zentrifugieren (Trocknung)
- neues Eppendorf Röhrchen nehmen
- 50 µl ddH₂O auf die Säule geben/ 1min auf Eis inkubieren
- 1min mit 6000g zentrifugieren
- RNA-Konzentration photometrisch bestimmen

Tab. 11: Reagenzien; Volumina; RNA Isolierung aus Sertoli Zelllinien.

3.3.2. Aufreinigung der RNA

Um eine DNA-freie RNA zu erhalten wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wird die RNA mit einer DNase, sowie einem Ribonucleaseinhibitor versetzt und eine anschließende Reinigung durchgeführt. Es wurde dafür das RNase-Free DNase Set (Qiagen) nach Standard Protokoll benutzt, siehe Tabelle 12.

RNA-Aufreinigung

(1 µg RNA)

Reagenzien	Volumen (µl)
RDD Puffer	2
DNase	0,2
RNase J	0,3

Gesamtvolumen	2,5

- gesamten Ansatz für 30 min bei 37°C inkubieren
- danach Zugabe von 1 µl EDTA (0,25M)
- abschließend 5 min bei 65°C inkubieren

Tab. 12: Reagenzien; Volumina; RNA Aufreinigung nach Isolierung aus Sertoli-Zelllinien.

3.3.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der cDNA-Synthese (cDNA = complementary DNA) bedient man sich eines Virusenzym, der sog. Reversen Transkriptase. Dieses Enzym ist in der Lage aus RNA DNA zu synthetisieren. Im Prinzip schmilzt man zuerst die vorher mit Primern versetzte RNA bei 70° Celsius auf. Anschließend lässt man den Ansatz abkühlen, damit die Primer hybridisieren können. Dann gibt man noch Nucleotide, Puffer, RNase-Inhibitoren und Reverse Transkriptase hinzu und inkubiert für eine Stunde bei 37° Celsius.

Zum Einsatz kam hier das Omniscript RT Kit (Qiagen) nach Standard-Protokoll. Die Ansätze wurden jeweils einmal mit Reverser Transkriptase und einmal ohne Reverse Transkriptase angesetzt, um anschließend mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese

die korrekte Umschreibung visualisieren zu können. Die Menge an umgeschriebener cDNA wurde mittels Photometer (Eppendorf) bestimmt, siehe Protokoll Tabelle 13.

cDNA-Synthese

(1 µg RNA eingesetzt)

Reagenzien	Volumen (µl)	
10x Puffer	2	
dNTP's	2	
RNase	0,7	
Oligo's	0,2	
Omniscript RT	1	/ ohne Omniscript RT
RNase free water	4,1	/ 5,1

Gesamtvolumen	10	
+ RNA	1	

- RNA auf Eis auftauen lassen
- Primer und RNase Inhibitor mischen (5 sec vortexen)
- dNTP'S, Oligo's, Omniscript RT und 10x Puffer mischen
- beides zu MasterMix vereinen
- RNA zufügen
- 1 h bei 37° C inkubieren

Tab. 13: Reagenzien; Volumina; Protokoll cDNA Synthese.

3.3.4. Amplifikation eines AR in Sertoli Zelllinien

Für die Amplifikation auf einen jeweils eigenen AR in den vier zu untersuchenden Sertoli- Zelllinien, wurden folgende Primer verwendet: Vorwärtsprimer: 5'- CAC ATC CTG CTC AAG GCG CTT –3' und Rückwärtsprimer: 5'– CCC AGA AAG GAT CTT GGG CAC –3'. Die RT-PCR wurde mit dem Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) nach Standardprotokoll durchgeführt, siehe Tabelle 14.

Reagenzien	Volumen (µl)	PCR Programm:
PCR MM		<u>95°C 4min</u>
PCR MasterMix	34	94°C 40 sec
Primer F	2,5	60°C 45 sec } 35 Zyklen
Primer R	2,5	<u>72°C 1 min 30 sec</u>
DNA	1	72°C 5 min
ddH ₂ O	10	

Gesamtvolumen	50	

Tab. 14: Reagenzien; Volumina; PCR auf AR in Sertoli Zelllinien.

3.3.4.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion

Mit 1x TAE-Puffer wurde ein 1,8 %iges Agarose-Gel gegossen (1,8 g Agarose (Roti®Garose, Roth) in 100 ml TAE Puffer gelöst), in die Gelkammer eingesetzt, mit 1x TAE-Laufpuffer überschichtet und für 60 min bei 100 V Spannung laufen gelassen. Als Größenmarker diente eine Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas). Zur Detektion der cDNA wurde das Gel für 30 min unter Schütteln mit Ethidiumbromid (Roth) gefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mit dem UV-Transluminator (ImageMaster).

3.4 Transfektion hAR CAG 18 und CAG 36

3.4.1. Zellkulturbedingungen 93RS2 Zellen

Die 93RS2 Sertoli Zellen werden in einer 5 prozentigen CO₂ Atmosphäre bei 34°Celsius kultiviert. Das Standard Kulturmedium enthält DMEM high glucose gemischt im Verhältnis 1:1 mit Ham's F-12 Medium plus 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 10% FBS-Gold (Gesamtprotein 3,0-4,5 g/dl), und 1 % ITS (1000 mg/l Insulin, 550 mg/l Transferrin, 0,68 mg/l Selenin).

3.4.2. Selektionsvorversuch

Um sicherzustellen, dass nur Zellen die die hAR-DNA in ihr Genom integriert haben, die spätere Antibiotikaselektion überleben, wurde zuvor eine Testreihe mit verschiedenen Konzentrationen des Selektionsantibiotikums Blastizidin an untransfizierten 93RS2 Zellen durchgeführt. So konnte ermittelt werden, bei welcher Konzentration an Blastizidin im Zellkulturmedium die untransfizierten Zellen absterben, siehe Tab. 15

(200.000 93RS2 Zellen/ 6-Well-Platte)

Zugabe von Blastizidin (µg/ml Medium) zum Zellkulturmedium (siehe 3.4.1.)

1
2
5
10
15
20

- Vitalität/Mortalität jeweils nach 24 und 48h überprüft

Tab. 15. Selektionsversuch an untransfizierten 93RS2 Zellen.

3.4.3. Transformation der AR-Klone

Für die Transfektion wird eine cDNA mit möglichst hoher Reinheit benötigt.

Die Klone mussten daher erneut transformiert, das heißt über chemisch kompetente Bakterienzellen (*E. coli*) vermehrt werden, siehe Tabelle 16

- 1 µl (50 ng) jedes Klones auf die *E. coli* (TopTen) Zellen geben
- 30 min auf Eis stehen lassen
- für 30 sec bei 42° Celsius inkubieren (heat shock)
- sofort wieder auf Eis stellen
- 250 µl SOC Medium zugeben
- für 60 min bei 37° Celsius im Schüttler inkubieren
- jeden Vektoransatz auf 3 LB-Amp-Platten ausplattieren (50 µl, 100 µl, ca. 110 µl Zellsuspension)
- über Nacht im Brutschrank bei 37° Celsius inkubieren
- gewachsene Kolonien beurteilen und „picken“
- je eine Kolonie in 100 ml LB-Amp-Medium geben (2 Kolonien pro Klon)
- über Nacht im Schüttler bei 37° Celsius inkubieren (17h)
- Midi-Präparation

Tab. 16: Reagenzien; Volumina; Transformation der AR Klone (AR CAG18 und AR CAG36).

3.4.4. DNA-Midi Präparation

Im Unterschied zur Mini Präparation erhält man bei der Midi Präparation eine größere Ausbeute an cDNA. Eine präparierte cDNA ist allerdings immer zu einem bestimmten Anteil mit anderen Molekülen wie Proteinen und anderen organischen Bestandteilen kontaminiert. Da bei der Midi-Präparation im Gegensatz zur Mini-Präparation die DNA zusätzlich noch mit Isopropanol präzipitiert wird, ist eine höhere Reinheit zu erwarten. Die photometrisch ermittelte Absorption bei 260 und 280 Nanometer ($A_{260/280}$) wird benutzt, um die Reinheit der cDNA abzuschätzen. Eine reine cDNA hat eine $A_{260/280}$ von etwa 1.8. Die Midi-Präparation wurde mit einem NucleoBond®Xtra Midi Kit (Marcherey-Nagel) durchgeführt, wobei das Standardprotokoll an einigen Punkten ergänzt, bzw. abgeändert wurde. So wurde das Bakterienpellet einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS unterzogen und bei der Alkoholfällung mit Isopropanol wurde

sowohl bei RT, als auch auf Eis eluiert. Die nach Alkoholfällung im Probenröhrchen verbliebenen Ethanolreste wurden nicht wie im Standardprotokoll bei RT trocknen gelassen, sondern aktiv mit einer Wasserstrahlpumpe über eine sterile Pasteurpipette abgesaugt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Kühlzentrifuge bei 4°Celsius mit 6000 g. Die Trocknungszeit der Pellets nach dem Absaugen des Ethanols und die Menge des ddH₂O zum Lösen der Pellets, wurde der jeweiligen Ausbeute an DNA im unten angegebenen Rahmen angepasst, Protokoll siehe Tab. 17

- 50 ml der Bakteriensuspension für 20 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- restliche 50 ml Bakterienkultur ins selbe Tube geben
- 20 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- in 10ml PBS waschen (vortexen) und 20 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- in 10 ml Puffer RES resuspendieren (Pipette)
- mit 10 ml Puffer LYS Zellen lysieren (5x invertieren, dann 5 min bei RT stehen lassen)
- mit 10 ml Puffer NEU neutralisieren (12x invertieren, dann 30 min zentrifugieren)
- Filter in die Säule stecken und mit 12 ml Puffer Equ equilibrieren
- Säule beladen (nur klare Flüssigkeit)
- nach vollständigem Durchlauf mit 5 ml Puffer Equ waschen
- Filter verwerfen
- Säule mit 8 ml Puffer Wash waschen
- mit 5 ml Puffer Elu in neues Tube eluieren
- mit 4 ml 0,75% Isopropanol erst 2 min RT, dann 5 min auf Eis eluieren
- vortexen und 90 min zentrifugieren
- sofort nach Stand der Zentrifuge Überstand dekantieren und Tube trockentupfen
- Pellet mit 2ml Ethanol (70%) waschen (am Tube herunterlaufen lassen)
- 2-5 min bei Raumtemp. inkubieren
- 30 min zentrifugieren
- dekantieren und über Kopf stehen lassen
- mit steriler Pasteurpipette (Wasserstrahlpumpe) Ethanolreste absaugen
- bei Raumtemperatur 5-10 min trocknen
- in 50-200 µl ddH₂O (je nach Pellet) über Nacht bei 4°C lösen

weitere Schritte des Protokolls am nächsten Morgen:

Konzentration der DNA und A_{260/280} photometrisch bestimmen

Tab. 17: Reagenzien; Volumina; Midi-Präparation

3.4.5. Transfektion

Transfektion bedeutet, dass Fremd-DNA in eine Wirtszelle geschleust wird. Dies geschieht zumeist über die bereits beschriebenen Plasmid-Vektoren. Sie bilden eine Art Transportvehikel für Fremd-DNA. Eine Transfektion kann über verschiedene Methoden wie etwa die Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofektion, Elektroporation, Transfektion durch Beschuss, Magnet Assisted Transfection etc. erfolgen. Die Transfektionsmethode muss dabei vom jeweiligen Zelltyp und dessen Eigenschaften abhängig gemacht werden.

Eine seit langem bekannte und ohne größeren materiellen Aufwand zu betreibende Methode ist die so genannte Calciumphosphat-Präzipitation. Bei der Calciumphosphat-Präzipitation werden DNA, Calcium und Phosphatpuffer gemischt und auf die Zellen gegeben. Die sich bildenden Calciumphosphatkristalle werden dann durch Endozytose von den Zellen aufgenommen (Chen al. 1988). Eine zweite weit verbreitete Transfektionsmethode ist die Elektroporation. Bei dieser Methode wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert und die DNA kann so in die Zellen diffundieren (Baum et al. 1994).

Des Weiteren unterscheidet man bei der Transfektion zwischen transienter- und stabiler Transfektion. Bei der transienten Transfektion wird die DNA nur zeitweise in die Wirtszelle gebracht, bei der stabilen Transfektion ins Genom der Zelle integriert.

Um eine stabile Transfektion zu erreichen, bedarf es entsprechender Zellkulturbedingungen. Über die Zugabe eines Antibiotikums in das Zellkulturmedium werden die Zellen selektioniert. Der transfizierte Vektor besitzt für dieses Antibiotikum ein entsprechendes Resistenzgen. Nach ein bis zwei Zellpassagen der transfizierten Zellen wird dem Zellkulturmedium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt und dann für zwei bis drei Wochen kultiviert. Lediglich die Zellen, die die transfizierte DNA in ihr Genom aufgenommen haben und somit das Resistenzgen exprimieren, überleben.

Die Transfektion in die 93RS2 Ratten-Sertoli-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Für die Experimente wurde der Microporator MP-100 (peqlab) benutzt. Es wurde ein Pellet aus 200.000 Zellen in 10 Mikroliter Resuspensionspuffer gelöst und dann zwei Mikroliter cDNA (1 µg/µl DNA) zugegeben, siehe Tab. 18

- Zellen in Kulturmedium ohne Antibiotika aussäen
- bis ca. 85% optische Konfluenz wachsen lassen
- Zellen ablösen (Trypsin) und Zellzahl bestimmen
- auf 200.000 Zellen/Well einstellen
- Zellsuspension 5 min bei 500 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 10 µl Resuspensionspuffer aufnehmen
- 2 µl DNA (1 µg/µl) zu pipettieren
- Küvette am Microporator mit 3 ml Elektrolyse-Puffer befüllen
- mit Microporator-Pipette und Gold-Tip-Pipettenspitze 10 µl Zellsuspension aufnehmen
- Pipette in den Microportor stellen
- auf 1150 mV, 20 msec und zwei Pulse einstellen
- microporieren
- Zellsuspension in 6-Well-Platte aussäen
- 24 h bei 5% CO₂ und 34° C inkubieren

nach 24 und 48 h Wachstum + Leuchten von GFP beurteilen

nach 48 h Mediumwechsel und Zugabe von Blastizidin

Tab. 18: Reagenzien; Volumina; Transfektion mit MP-100

3.4.6. optische Kontrolle des Transfektionserfolgs

Eine optische Kontrolle des Transfektionserfolgs wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) wurde das grüne Leuchten des c-terminal am transfizierten hAR hängenden GFP beurteilt, damit eine Entscheidung bezüglich weiterer Selektion mit Antibiotika getroffen werden konnte.

3.4.7. Antibiotikaselektion

Nach der ersten Zugabe des Selektionsantibiotikums Blastizidin in der vorher ermittelten, für untransfizierte Zellen letalen Konzentration, wurden die Zellen bis zu einer optischen Konfluenz von etwa 80% inkubiert. Abhängig vom Wachstum der Zellen erfolgten in 72 oder 96 Stunden Abstand ein Mediumwechsel und eine erneute optische Kontrolle auf die Expression des hAR über das Leuchten des GFP. Jeder zweite Mediumwechsel erfolgte ohne die Zugabe von Blastizidin. Nach drei Wochen Selektion wurden die transfizierten Zellpassagen molekularbiologisch weiter auf die gewünschten Eigenschaften hin überprüft.

3.5. Charakterisierung der transfizierten Zelllinien

3.5.1. Immunfluoreszenz hAR

Bei der Immunfluoreszenz wird prinzipiell zunächst der Zellverband fixiert und dann ein Antikörper gegen das gesuchte Antigen zugegeben. In dem folgenden Versuch wurde ein indirektes Nachweisverfahren, also die Verwendung von zwei Antikörpern, durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden zuerst mit einem spezifischen unmarkierten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet an das Antigen. Der Antikörper wird dann seinerseits mit einem zweiten, für den ersten Antikörper spezifischen Antikörper nachgewiesen, der mit einem Fluorescein (fluoreszierender Farbstoff) gekoppelt, also markiert ist. Die Verwendung von zwei Antikörpern führt bei diesem indirekten Nachweisverfahren zu einer wesentlichen Fluoreszenzverstärkung. Die Fluoreszenz kann dann mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops gesichtet werden.

Für diesem Versuch wurden jeweils 200.000 Zellen mit 2 Milliliter Zellkulturmedium ohne Antibiotikum in 6-Well-Platten ausgesät und für 48 Stunden bei 34° Celsius inkubiert. Detektiert wurde auf humanen AR und auf GFP. Da das GFP über den Expressionsvektor an den transfizierten humanen AR gekoppelt ist, kann es ebenfalls als Nachweis für diesen dienen. Für die Immunfluoreszenz wurde das Protokoll in Tabelle 19 verwendet.

- Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixieren
- 3x waschen mit PBS
- mit 0,1% Triton x-100 Zellmembran durchlässig machen
- in eine 12-Well-Platte überführen
- mit PBS waschen
- blocken mit 3% BSA (Bovine Serum Albumin) in TBST (Tris-buffered Saline and Tween 20)
- mit PBS waschen
- 1. AK: rb anti GFP (ABCAM, ab290) in der Verd. 1:200 in 1% BSA gelöst zugeben
- 3 Stunden bei RT inkubieren
- waschen mit PBS
- 2. AK: goat anti rb Alexa 488 (Invitrogen) in der Verd. 1:200 mit 1% BSA in TBST gelöst zugeben
- 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemp. inkubieren
- waschen mit PBS
- Zellen einbetten mit Vectashield + DAPI (Vector Laboratories, H-1200)
- mit Fluoreszenzmikroskop auswerten

Tab. 19: Reagenzien; Volumina; Immunfluoreszenz GFP

3.5.2. aus transfizierten Zelllinien

Die beiden stabil transfizierten Zelllinien wurden 93RShAR18 und 93RShAR36 benannt. Von beiden Zelllinien wurde zunächst RNA nach demselben Protokoll wie in 3.3.1 isoliert.

3.5.3. RNA Aufreinigung

Der anschließende DNase-Verdau erfolgte nach Protokoll von 3.3.2.

3.5.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription folgte demselben Protokoll wie in 3.3.3 beschrieben.

3.5.5. Amplifikation hAR

Amplifiziert wurde der hAR aus der Sertolizell-cDNA von 93RShAR18 und 93RShAR36 mit dem Primerpaar:

5'– TAT CCC AGT CCC ACT TGT G –3'

5'– CCT CAA TGA ACT GGG AGA GA –3',

nach folgendem PCR Programm über 35 Zyklen. Die PCR wurde an einem T3 Thermocycler (Biometra) nach Protokoll in Tab. 20 durchgeführt.

Reagenzien	Volumen (µl)	PCR Programm:
PCR MM		<u>94°C 4 min</u>
PCR MasterMix	34	94°C 45 sec
Primer F	2,5	55°C 45 sec } 35 Zyklen
Primer R	2,5	<u>72°C 1 min 30 sec</u>
cDNA	1	72°C 5 min
ddH ₂ O	10	

Gesamtvolumen	50	

Tab. 20: Reagenzien; Volumina; PCR auf hAR.

3.5.5.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion

Die Agarosegelelektrophorese und die anschließende Detektion erfolgten wie in 3.3.4.1 beschrieben.

3.5.6. Western Blot

Ein Western Blot ist der Versuch vorher elektrophoretisch getrennte Proteine dauerhaft auf einer Membran zu fixieren. Dazu wird die molekulargewichtsabhängige Wanderung der einzelnen Proteine in einem elektrischen Feld ausgenutzt. Die Proteine werden also zunächst gelelektrophoretisch getrennt, anschließend auf einer Nitrozellulose-Membran fixiert, angefärbt und damit schließlich sichtbar gemacht. Die zu untersuchenden Proteine werden zuvor aus den zu untersuchenden Geweben, Zellen etc. extrahiert, die Proteinkonzentration gemessen und diese dann mittels Verdünnung auf eine normierte Protein-Konzentration eingestellt.

Im Prinzip besteht ein Western Blot aus folgenden Teilschritten: *Probenvorbereitung – Gelelektrophorese – Transfer (Blotting) – Nachweisreaktion – Detektion*

(Frey et al 2007), Protokolle der einzelnen Teilschritte siehe Tabellen 21 bis 30.

1.) Proteinextraktion:

Hierfür wurden aus eingefrorenen 93RS2-Zellen sowie 93RShAR18-Zellen und 93RShAR36-Zellen die Proteine extrahiert. Die Proteine für die Positivkontrollen stammen aus der Veterinär-Anatomie. Diese wurden aus Hodenhomogenat von Patienten mit normaler Spermatogenese extrahiert, siehe Tabelle 21.

- Gefrorene Zellprobe in ein eiskaltes 2,2 ml Tube überführen
- 250 µl auf 95°C erwärmtes Roti-Load 1 (Roth) in Tris Puffer zugeben und vortexen
- Tubes für 10 min im Wasserbad bei 95°C inkubieren
- 250 µl Isopropanol zugeben und vortexen
- 5 min bei Raumtemp. stehen lassen anschließend vortexen
- 10 min bei 14000 g zentrifugieren (4°C)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2 ml 95% igem Ethanol mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid lösen und vortexen
- 20 min bei Raumtemp. stehen lassen anschließend vortexen
- 5 min bei 14000 g zentrifugieren (4°C)

- Lösen des Pellets in 95% igen Ethanol 3 mal wiederholen
- Pellet in 2 ml 70% igen Ethanol lösen und vortexen
- 20 min bei Raumtemp. stehen lassen anschließend vortexen
- 5 min bei 14000 g zentrifugieren (4°C)
- Überstand verwerfen (Restflüssigkeit vorsichtig entfernen)
- Pellet für 10-20 min im Brutschrank bei 37°C trocknen
- 250 µl SDS (Lauryl-Sulfat Na-Salt, Sigma) zugeben und vortexen
- 1 h bei 70°C (Wasserbad) inkubieren
- 10 min bei 14000 g zentrifugieren (4°C)
- Überstand absaugen und in Tube zur Proteinmessung überführen
- Pellet verwerfen

Tab. 21: Reagenzien; Volumina; Proteinextraktion aus 93RS2, 93RshAR18 und 93RshAR36.

2.) Proteinmessung (photometrisch):

Messung der Proteine mit der BCA-Methode: Im ersten Schritt nutzt man die bekannte Reaktion, dass in alkalischem Medium Cu^{2+} -Ionen durch Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Es bildet sich ein hellblauer Komplex. In einem zweiten Schritt wird Bicinchinonsäure zugesetzt, die Cu^+ -Ionen bilden mit dieser schließlich einen violetten Farbkomplex. Dieser Farbkomplex ist wasserlöslich und wird photometrisch gemessen. Bei 560nm gibt es eine starke Absorption, linear ansteigend mit der Proteinkonzentration, Protokoll siehe Tab. 22.

- 100 µl BCA Protein Assay Reagent A (Pierce) + 2 µl Protein Assay Reagent B
- Lösungen mischen
- 95 µl des Gemisches aus Protein Assay Reagent A und B 5 µl BSA (2mg/ml) hinzufügen
30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren
- *Messung innerhalb von 10 min durchführen um gleichbleibende Ergebnisse zu erhalten*
- Küvette mit 100 µl Aqua dest. Befüllen; *Blank*: 0.000E
- Küvette mit 100 µl Standardgemisch befüllen; *Sample*
- Vorgang nach Entleerung mit BSA wiederholen
- Messvorgang mit Proben wiederholen
- Verdünnung wenn Proteinkonzentration außerhalb der Kalibrierung: 2,5 µl Probe + 2,5 µl 1% ige SDS- Lösung, dann fortfahren wie oben.

Tab. 22: Reagenzien; Volumina; Proteinmessung.

3.) *Probenvorbereitung (µg/ml)*

- 13 µl Probe mit 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen) und 2 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent (Invitrogen) vermischt
- Proben kurz vortexen
- Hitzedenaturierung der Proben in einem 70 °C Wasserbad für 10 min

Tab. 23: Volumina, Protokoll Probenvorbereitung Western Blot

4.) *Gelelektrophorese*

- (für die Außenkammer): 50 ml 20 × NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) mit 950ml Aqua bidest verdünnen
- (für die Innenkammer): 200 ml 1 × NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) mit 500ml
- NuPAGE® Novex 10% BIS-Tris Mini Gel (1,0 mm × 12 Wells) in die Elektrophoresekammer
- (XCell SureLock™) einsetzen
- Äußere und innere Gelkammer mit o.a. Puffern befüllen
- 5 µl vom Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) und 15 µl Proben-Mix in jeweils eine Geltasche pipettieren
- Elektroden anschließen und bei 200 V Spannung 60 min laufen lassen

Tab. 24: Reagenzien; Volumina; Protokoll Gelelektrophorese.

5.) *Transfer (Blotting)*

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im „Semi-Dry-Blot-Verfahren“ auf die Trägermembran übertragen.

- Nitrozellulose-Membran (0,45 µm Porengröße), Filterpapiere und Sponge Pads in NuPAGE® Transfer Buffer einweichen
- Gel aus der Kammer nehmen und Filterpapier auf das Gel legen und von der Platte lösen
- Blotting-Modul (XCell 2™) von unten nach oben aufbauen: 3 Sponge Pads; Filterpapier; Nitrozellulose-Membran; Gel; Filterpapier; 2 Sponge Pads.
- Blotting-Modul in die Kammer (XCell SureLock™) einsetzen und mit NuPAGE® Transfer Buffer befüllen
- äußere Kammer mit Aqua bidest befüllen
- bei einer Spannung von 30 V für 60 min blotten

Tab. 25: Reagenzien; Volumina; Transfer der aufgetrennten Proteine.

6.) Nachweisreaktion für hAR

a.) Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

- Nitrozellulose-Membran mit zum Gel zugewandter Seite in eine Inkubationsschale überführen
- Inkubationsschale mit Blockpuffer füllen
- auf Wippschüttler (WT 16) für 30 min bei Raumtemp. blocken
- Blockpuffer abschütten
- auf Wippschüttler, Membran 3 mal für jeweils 5 min in Waschpuffer waschen

Tab. 26: Protokoll Blockierung unspezifischer Bindungsstellen.

b.) Inkubation mit Primärantikörper

Zum Nachweis des AR in den transfizierten Zelllinien wurde ein polyklonaler IgG Antikörper AR(N-20) sc-816 (Santa Cruz Biotechnologie) aus Kaninchen in der Verdünnung 1:200 verwendet.

- Herstellen einer Verdünnung von 1:200 mittels Puffer 3 nach Herstellerangaben
- Membran über Nacht auf Wippschüttler bei Raumtemp. inkubieren
- Primärantikörpervedünnung abschütten
- auf Wippschüttler, Membran 3 mal für jeweils 5 min in Puffer 3 waschen

Tab. 27: Protokoll Inkubation mit Primärantikörper.

c.) Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Zum Nachweis des AR in den transfizierten Zelllinien wurde als Sekundärantikörper ein polyklonaler IgG Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen, E0432 (Dako, Hamburg) in der Verdünnung 1:400 verwendet.

- Herstellen einer Verdünnung von 1:400 mittels Puffer 3 nach Herstellerangaben
- Membran für 45 min auf Wippschüttler bei Raumtemp. inkubieren
- Sekundärantikörpervedünnung abschütten
- auf Wippschüttler, Membran 4 mal für jeweils 5 min in Puffer 4 waschen

Tab. 28: Protokoll der Inkubation mit dem Sekundärantikörper.

d.) Zugabe der Peroxidase (Vectastain Elite ABC Standard Kit)

- Herstellen einer ABC-Lösung nach Herstellerangaben
- Membran für 45 min auf Wippschüttler bei Raumtemp. inkubieren
- Sekundärantikörperverdünnung abschütten
- auf Wippschüttler, Membran 4 mal für jeweils 5 min in Puffer 4 waschen
- auf Wippschüttler, Membran 2 mal für jeweils 5 min in PBS-Puffer waschen

Tab. 29: Protokoll Zugabe der Peroxidase.

e.) Farbreaktion

- TrueBlue™ Peroxidase Substrat-Lösung auf die Membran geben
- Membran für 5 min unter dem Abzug (mit Alufolie abgedeckt) inkubieren
- TrueBlue™ Peroxidase Substrat-Lösung abschütten
- auf Wippschüttler, Membran 3 mal für jeweils 5 min in Aqua bidest waschen
- Membran im Trockenschrank bei 37°C (mit Alufolie abgedeckt) trocknen

Tab. 30: Protokoll Farbreaktion.

Beim Färbevorgang wurden Negativkontrollen mitgeführt, mit diesen wurde, mit Ausnahme der Inkubation mit dem primären Antikörper, genau wie mit den Proben verfahren. Anstelle des primären Antikörpers wurde bei diesen Kontrollansätzen der Puffer 3 verwendet.

7.) *Detektion hAR*

Nach visueller Betrachtung und Auswertung der Banden, wurden diese digital fotografiert (Canon Pixma MP510) und archiviert.

3.6. Stimulationsversuche 93RShAR18 und 93RShAR36

Zur Stimulation mit Testosteron wurden jeweils 200.000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte mit 2 Milliliter Kulturmedium ausgesät, jeder Ansatz in drei biologischen Replikaten. Das Kulturmedium entsprach in seiner Zusammensetzung den in 3.4.1. angegebenen Parametern, lediglich ein anderes, steroidfreies FBS (total bovine charcoal stripped FBS, Sigma) wurde verwendet und das Selektionsantibiotikum Blastizidin zugesetzt. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Das neue Medium enthielt kein Blastizidin mehr. Am Tag drei erfolgte ein zweiter Mediumwechsel, das Medium enthielt ebenfalls kein Blastizidin und der Anteil an FBS wurde von vorher 10 Prozent auf fünf Prozent gesenkt. Bei einer optischen Konfluenz der Zellen von 85 Prozent, etwa am Tag vier, erfolgte ein letztmaliger Mediumwechsel. Der Anteil an FBS betrug jetzt ein Prozent und Testosteron in den entsprechenden Konzentrationen wurde zugesetzt. Das Testosteron wurde in Ethanol gelöst. Die Ungiftigkeit für die Zellen, in der zum Lösen des Testosterons benötigten Konzentration, im Verhältnis zum Zellkulturmedium, wurde vorher überprüft. Um Werte zur Normierung der Genexpression zu erhalten, erfolgte auch eine „Stimulation“ ohne Testosteron, nur mit dem Lösungsmittel Ethanol.

3.6.1. Testosteronstimulation

Die drei Zelllinien 93RShAR18, 93RShAR36 und 93RS2 wurden für 24 und 48 Stunden in den Testosteronkonzentrationen 10^{-9} M bis 10^{-5} M wie oben beschrieben, simuliert.

3.6.2. Zeitreihe Testosteronstimulation

Die Stimulation erfolgte wie in 3.6 beschrieben für alle drei Zelllinien. Die Stimulation der nativen 93RS2 Sertoli-Zellen diente als Transfektionskontrolle, sollten sich durch die Transfektion mit dem humanen AR die biologischen Eigenschaften verändert haben. Es wurde mit einer Konzentration von 10^{-6} M Testosteron stimuliert. Das Testosteron verblieb für 1, 2 und 8 Stunden auf den Zellen.

3.6.3. Bestimmung der CAG-Repeat-Länge (PAGE-PCR)

Die Länge des CAG-Repeat könnte sich bei der Replikation in den Zelllinien nach Stimulation mit Testosteron ändern. Um zu ermitteln ob und wie sich die CAG-Repeat-Länge geändert hat, wurde eine PCR mit anschließender PAGE- (high resolution polyacrylamide gel electrophoresis) Elektrophorese durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine PCR nach bekanntem Prinzip, lediglich die Visualisierung unterscheidet sich. Man verwendet anstatt eines Agarosegels ein Polyacrylamidgel. Dieses Polyacrylamidgel bietet im Vergleich zu Agarosegelen eine bessere Auflösung kleiner DNA-Fragmente, was hier eine bis auf eine Base genaue Ermittlung der tatsächlichen CAG-Repeat-Länge erlauben soll. Die PAGE-PCR wurde für alle drei biologischen Replikate (N1-N3), in den Testosteronkonzentrationen 10^{-9} M bis 10^{-5} M und für das Lösungsmittel Ethanol alleine, nach einer Testosteronstimulation über 24 Stunden, durchgeführt. Für diesen Versuch wurde zunächst wie in 3.3.1. beschrieben, RNA aus allen drei biologischen Replikaten der Zelllinien 93RS2, 93RShAR18 und 93RShAR36 isoliert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung (Protokoll 3.3.2.) und dann über reverse Transkription wie in 3.3.3. das Umschreiben in cDNA. Um das CAG-Repeat zu amplifizieren verwendeten wir das Primerpaar 5' - AGT GAT CCA CCC GGG C -3' und 5' - TTG GGG AGA ACC ATC CTC A – 3' nach folgendem Protokoll in Tabelle 31 über 40 Zyklen.

Reagenzien	Volumen (µl)	PCR Programm:
PCR MM		<u>94°C 5min</u>
PCR MasterMix	34	94°C 60 sec
Primer F	2,5	55°C 60 sec } 40 Zyklen
Primer R	2,5	<u>72°C 60 sec</u>
cDNA	1	72°C 5 min
ddH ₂ O	10	

Gesamtvolumen	50	

Tab. 31: Reagenzien, Volumina, Protokoll PAGE-PCR.

3.6.3.1. Polyacrylamidgel

Für die Visualisierung der tatsächlichen CAG-Repeat-Länge wurde ein Polyacrylamidgel aus ddH₂O, 10x TBE (0.9 M Tris Base, 0,9 M Borat und 0,02 M EDTA) Elektrophoresepuffer, Acrylamid (SERVA Electrophoresis GmbH), APS (Ammonium persulfate analytical grade, SERVA) und TEMED (N,N,N'-Tetramethylethylene diamine research grade, SERVA) gegossen, siehe Tabelle 32.

Herstellung des Polyacrylamidgels

Reagenzien	Volumen (ml)
ddH ₂ O	56
Acrylamid (40%)	12
APS (0,1%)	0,4
TEMED	0,04

Gesamtvolumen	75,94

- Reagenzien mischen und 30 min bei Raumtemperatur aushärten lassen

Tab. 32: Reagenzien, Volumina, Polyacrylamidgel.

3.6.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion

Zur Detektion der CAG-Repeat Länge wurden 20 µl des PCR-Produkts gemischt mit 6 µl TBE Loading Dye auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel bei 20 mA für 30 min und dann bei 40 mA für 150 min laufen gelassen. Angefärbt wurde anschließend mit Ethidiumbromid (Roth); 100 µl pro 500 ml 10x TBE Elektrophoresepuffer) für 30 min. Abschließend erfolgte die Visualisierung mit einem UV-Transluminator (ImageMaster).

3.6.4. Ermittlung der Housekeeper für RT-qPCR

Ein Housekeeping Gen bezeichnet ein Gen, das von äußeren Einflüssen, wie dem Medium, der Zellart etc., in seiner Expression möglichst wenig reguliert wird. Um die mRNA-Expression der jeweiligen Ziel-Gene zu bestimmen, benutzt man diese Gene als endogene Kontrolle zur Normierung. Für den folgenden Real-Time qPCR Versuch war es notwendig, Gene zu finden, die durch eine Stimulation mit Testosteron möglichst wenig reguliert werden. Aus diesem Grund wurde eine PCR mit einer so genannten Housekeeperplatte durchgeführt.

Auf dieser 96-Well-Platte (TaqMan® Array Plate, rat endogenous control (Applied biosystems)) befinden sich die Primer für 32 verschiedene, als Housekeeping-Gen bei der Ratte in Frage kommende Gene.

Die zu untersuchende cDNA wird mit dem mitgelieferten MasterMix und ddH₂O vermischt und in die entsprechenden Wells pipettiert.

Wir untersuchten die Genexpression anhand der cDNA von über 24 Stunden mit Testosteron stimulierten 93RShAR18 Zellen. Diese wurden zum einen mit einer hohen Konzentration von 10^{-6} M Testosteron (1000 nmol/L) und zum anderen mit einer niedrigen Konzentration von 10^{-9} M Testosteron (1 nmol/L) stimuliert. Dies entspricht einem Teil der geplanten Stimulationsversuche, sowohl in der Testosteronkonzentration als auch der Stimulationsdauer. Die als Housekeeping-Gene für die geplanten Stimulationsversuche in Frage kommenden Gene sollten weder bei der hohen, noch bei der niedrigen Testosteronkonzentration einen nennenswerten Unterschied in der Expression zeigen. Die cDNA wurde nach bekanntem Protokoll (3.3.1. bis 3.3.3.) synthetisiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der lediglich mit dem Lösungsmittel Ethanol stimuliert wurde. Die quantitative PCR wurde an dem ABI 7300 Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems) im Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt. Es wurden 50 ng an cDNA eingesetzt und nach dem two-step Standardprotokoll der TaqMan® Array Plate, rat endogenous control amplifiziert, siehe Tabelle 33.

Reagenzien	Volumen (µl)	PCR Programm:
PCR MM		<u>95°C 10min</u>
TaqMan® MasterMix	10	95°C 15 sec
cDNA (10ng/ µl)	5	60°C 1 min } 40 Zyklen
ddH ₂ O	5	

Gesamtvolumen	20	

Tab. 33: Reagenzien, Volumina, Protokoll PCR Housekeeperplatte.

3.6.4.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion

Um zu kontrollieren, ob die quantitative PCR spezifische PCR Produkte geliefert hatte, wurden diese wie in 3.3.4.1. beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid ausgewertet.

3.7. Genexpressionsvergleich testosteronstimulierte Sertoli-Zelllinien

3.7.1. RNA-Isolation aus testosteronstimulierten Sertoli Zelllinien

Die RNA aus den stimulierten Sertolizellen von 93RS2, 93RShAR18 und 93RShAR36 wurde mit peqGold Total RNA Kit (Peqlab), wie in 3.3.1. beschrieben, isoliert.

3.7.2. Aufreinigung der RNA

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie unter 3.3.2. angegeben.

3.7.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription (cDNA-Synthese) erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie unter 3.3.3. angegeben.

3.7.4. Real-time quantitative PCR

Mit Hilfe der quantitativen PCR werden Nukleinsäuren quantifiziert, d.h. ermittelt wie viel von der gesuchten mRNA von dem entsprechenden Gewebe oder den Zellen

exprimiert wird. Bei der hier verwendeten Methode der Real-time quantitativen PCR, also der Echtzeit quantitativen PCR, benutzt man Fluoreszenzfarbstoffe, die an die DNA binden. Es entsteht ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, dessen Intensität mit einer speziellen Kamera nach jedem PCR-Zyklus, immer am Ende der Elongation, gemessen wird. Der Anstieg der Fluoreszenz ist mit dem Anstieg der DNA-Menge korreliert. Am Ende der PCR wird eine Quantifizierung für die Bereiche der PCR vorgenommen, in denen die Reaktion exponentiell verlief. Nur in diesen Bereichen sind die Bedingungen optimal und damit aussagekräftig. Da die Fluoreszenzfarbstoffe keine hohe Spezifität besitzen, schmilzt man am Ende der PCR die DNA auf, indem man die Temperatur langsam von 50 auf 95° Celsius erhöht. Die so ermittelte Schmelzkurve dient zur Kontrolle, ob spezifische PCR-Produkte amplifiziert wurden. Sie ergibt sich, da jede amplifizierte DNA bei einer spezifischen Temperatur denaturiert und durch die Trennung des Doppelstranges der angelagerte Fluoreszenzfarbstoff frei wird. Durch die Schmelzkurve ist eine Unterscheidung der erwünschten PCR-Produkte von unspezifischen Primerdimeren möglich. Zur weiteren Kontrolle, ob es sich bei dem PCR-Produkten aus der Real-time quantitativen PCR um spezifische Produkte mit bekannter Länge handelt, kann man diese auf ein Agarosegel auftragen. Um die mRNA-Expression der zwei Zielgene und der zwei Housekeeper-Gene zu ermitteln, wurde ein QuantiTect® Primer Assay (Qiagen) und ein QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Alle Real-Time qPCR Experimente wurden an einem CFX-96 Cycler (biorad) nach einem zwei Schritt Protokoll mit anschließender Schmelzkurve durchgeführt.

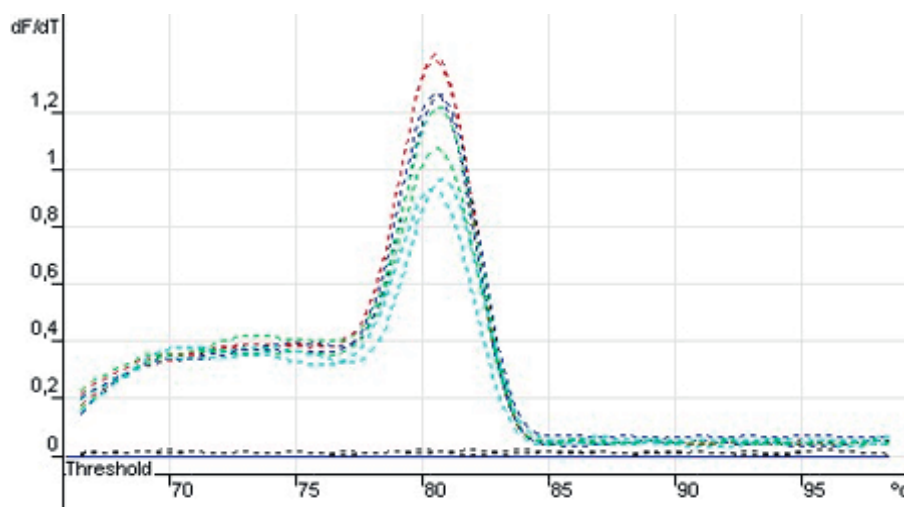


Abb. 7. Schmelzkurve beispielhaft für Clusterin in den 93RS2-Zellen. Die Kurve zeigt deutlich, dass keine Verunreinigungen durch andere Produkte bei der PCR aufgetreten sind.

In dem verwendeten Protokoll nach dem QuantiFast SYBR Green PCR Kit, sind der Anlagerungs- und der Kettenverlängerungsschritt kombiniert. Um die mRNA-Expression der beiden Housekeeper-Gene und der zwei Zielgene zu detektieren, wurden alle drei biologischen Replikate (N1 bis N3) und jede Testosteronkonzentration (von 10^{-9} M bis 10^{-5} M und die Kontrolle ohne Testosteron) für jede der drei Zelllinien einzeln auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Pro Zelllinie wurden drei unabhängige technische Replikate durchgeführt.

Die Expressionsergebnisse wurden normiert, indem die normierte Quantifizierung auf eine Vergleichsmessung mit definierten Standards bezogen wurde.

Als definierte Standards dienten die zwei mit Hilfe der Housekeeperplatte in 3.6.4. ermittelten, von der Stimulation mit Testosteron in der Genexpression nahezu unveränderten Housekeeper-Gene. Protokoll für diese PCR siehe Tabelle 34. Zur Berechnung möglicher Expressionsunterschiede diente die $\Delta C(t)$ -Methode.

Reagenzien	Volumen (μ l)	PCR Programm:
PCR MM		<u>94°C 5min</u>
2x Quanti Fast SYBR		95°C 10 sec
Green PCR MasterMix	12,5	60°C 30 sec } 35 Zyklen
10x QuaniTect Primae Assay	2,5	-----
ddH ₂ O	9	Aufschmelzen der PCR-Produkte
cDNA (100 ng/ μ l)	1	50 – 95° C

Gesamtvolumen	25	

Tab. 34: Reagenzien, Volumina, Protokoll Real-time quantitative PCR.

3.7.4.1. Agarosegelelektrophorese und Detektion

Um zu kontrollieren ob die RT-qPCR spezifische PCR-Produkte geliefert hatte, wurden einige PCR-Produkte wie in 3.3.4.1. beschrieben, auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Proben der beiden Zielgene hAR und Clusterin ohne Testosteronstimulation für alle drei Zelllinien (93RS2, 93RShAR18 und 93RShAR36) in drei unabhängigen biologischen Replikaten wurden aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Transluminator (ImageMaster).

3.7.5 Clusterin-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Als ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht, die über mehrere Schritte generiert wird.

Eine oft verwendete ELISA-Technik ist der sogenannte Sandwich-ELISA, hierbei wird neben einem an eine Platte fest gebundener Antikörper (bei kommerziellen Kits ist dieser an eine 96-Well- Mikrotiterplatte gebunden) noch ein zweiter Antikörper verwendet, der an anderer Stelle an das Antigen bindet. Zu dem auf der Mikrotiterplatte fest gebundenen Antikörper wird als erstes die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen gegeben und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der Antikörper an das in der Probe befindliche Antigen.

Um ungebundene Bestandteile zu entfernen wird die Platte gewaschen, damit lediglich das am Coating-Antikörper gebundene Antigen zurückbleibt. Im nächsten Schritt wird der Detektions-Antikörper zugegeben. An dessen Ende ist ein Enzym, meist eine Peroxidase gebunden. Durch die Bindung dieses zweiten Antikörpers an das Antigen entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Die Platte wird erneut gewaschen. Damit das Antigen detektiert, bzw. quantifiziert werden kann, wird jetzt das zum Enzym passende Substrat zugegeben. Das Substrat wird zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt. Das Signal dieses Produktes wird gemessen und unter Zuhilfenahme einer Kalibrierungskurve (ermittelt aus einer Serie bekannter Antigenkonzentrationen) quantitativ ausgewertet.

3.7.5.1. Testosteronstimulation 48 h für ELISA

Für den ELISA verwendeten wir die gleichen Zellen, aus denen auch die cDNA, für die Real-time quantitative PCR in 3.7.4. synthetisiert wurde, um eine Längenveränderung des CAG-Repeat nach erneuter Stimulation mit Testosteron auszuschließen. Die untersuchten Zellen 93RShAR18, 93RShAR36 und 93RS2 waren für diesen Versuch über 48 Stunden in den Testosteronkonzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M inkubiert worden, Protokoll der Probenvorbereitung siehe Tabelle 35.

3.7.5.2 Probenvorbereitungen für ELISA

- Zellsuspensionen aus 3.6.1.
- Zellzahl wurde ausgezählt und durch entsprechende Verdünnung mit Medium angeglichen
- 5 µl Zellsuspension in 195 µl Dilution Buffer (Abnova) pipettieren (=Dilution A)
- vorsichtig vortexen
- 5 µl dieser Suspension in 245 µl Dilution Buffer (Abnova) pipettieren (= Dilution B)
- vortexen

Tab. 35: Reagenzien, Volumina, Probenvorbereitung für ELISA.

3.7.5.3. ELISA

Um die Proteinkonzentration des Proteins Clusterin in den 93RShAR18-Zellen, 93RShAR36-Zellen und den 93RS2-Zellen zu bestimmen, wurde ein RAT Clusterin ELISA Kit (Abnova) verwendet. Die einzelnen Komponenten wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Protokoll, siehe Tabelle 36:

- 100 µl Kalibrator, Qualitätskontrolle und verdünnte Probe in die vorbereiteten Wells pipettieren
- Bei Raumtemp. 1 h inkubieren und mit 400 g auf einem Microtiterplattenshaker schütteln
- jedes Well mit jeweils 0,35 ml Wash- Solution 3 mal waschen
- 100 µl Biotin-Labeled Antibody Solution zugeben
- Bei Raumtemp. 1 h inkubieren und mit 400 g auf einem Microtiterplattenshaker schütteln
- jedes Well mit jeweils 0,35 ml Wash-Solution 3 mal waschen
- 100 µl Streptavidin-HRP Conjugate zugeben
- Bei Raumtemp. 1 h inkubieren und mit 300 g auf einem Microtiterplattenshaker schütteln
- jedes Well mit jeweils 0,35 ml Wash-Solution 3 mal waschen
- 100 µl Substrate Solution zugeben und Microtiterplatte mit Alufolie abdecken
- Bei Raumtemp. für 10 min inkubieren
- 100 µl Stop-Solution zugeben um Farbreaktion zu stoppen
- Microtiterplatte im ELISA-Reader bei 450 nm auslesen (innerhalb 10 min)

Tab. 36: Protokoll ELISA.

Die Kalkulation der analysierten Konzentrationen (ng/ml) wurde mit Hilfe des Auswertungsprogrammes des TECAN-ELISA-Readers berechnet. Die Absorption auf der Y-Achse wurde gegen den log der bekannten Konzentration des Kalibrators auf der X-Achse aufgetragen, daraus ergab sich die Eichkurve (Daten nicht gezeigt).

3.8. Statistik

Die Auswertung der RT-qPCR erfolgte mit Hilfe der CFX Manager ® Software (Bio-Rad). Als Ct (*threshold cycle*) wird der Zyklus der RT-qPCR bezeichnet, bei dem die gemessene Fluoreszenz eine festgelegte Marke, den Threshold, überwunden hat. Der Schwellenwert wurde von der Software so berechnet, dass die Amplifikation in diesem Bereich exponentiell stattgefunden hat. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden zuerst die Δ Ct-Werte der Zielgene AR und Clu berechnet. Die Δ Ct-Werte wurden aus den Mittelwerten der biologischen Replikate (N1-N3) der Zielgene Clusterin und hAR gegen die Mittelwerte (N1-N3) jedes Housekeeping-Gens (Ubc und Rplp₂) einzeln berechnet (Δ Ct-Werte = Mittelwert Ct Zielgen (N1-N3) – Mittelwert Ct Housekeeper (N1-N3)). Von diesen normierten Δ Ct-Werten werden dann die Werte einer Kontrolle in diesem Fall der „Stimulation“ ohne Testosteron abgezogen ($\Delta\Delta$ Ct-Werte = Δ Ct- Test - Δ Ct-Kontrolle), der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen dem Test und der Kontrolle (Ratio) normalisiert zum Referenzgen (Housekeeping-Gen) und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der Formel: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Die Graphen wurden erstellt mit dem Programm Graph Pad Prism. Es werden hier die Δ Ct-Werte gezeigt, da die Unterschiede der Rohdaten (Ct-Werte) schon sehr gering waren. Es wurde für diese RT-qPCR keine statistische Auswertung durchgeführt, da diese lediglich dazu dienen sollte, Hinweise auf eine Veränderung in der Expression von AR und Clusterin in einer bestimmten Testosteronkonzentration zu liefern. Mittels ELISA konnten dann für die beiden Zellsysteme nur die Testosteronkonzentrationen untersucht werden, in denen überhaupt eine Veränderungen in der Genexpression von Clusterin auftraten.

Die statistische Auswertung der Daten des ELISA erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 19.0 (IBM Deutschland GmbH, München). Zur statistischen Auswertung des Clusterin-ELISA wurden zunächst die Mittelwerte der drei biologischen Replikate jeder Zelllinie auf Normalverteilung überprüft. Dann wurde ein ANOVA-Test (*analysis of variance*) für die beiden Testosteronkonzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M einzeln durchgeführt um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu ermitteln. Da dieser signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei Gruppen, bzw. 2 Zelllinien bei beiden Testosteronkonzentrationen

ergab, wurde jeweils ein t-Test angeschlossen. Mit Hilfe dieses Tests wurden die Mittelwerte der Clusterinkonzentrationen der drei biologischen Replikate auf signifikante Abweichungen untereinander überprüft. Konkret hieß dass, zwischen den 93RS2-Zellen und den 93RShAR17-Zellen, zwischen den 93RS2-Zellen und den 93RShAR13-Zellen, sowie zwischen den 93RShAR17-Zellen und den 93RShAR33-Zellen. Außerdem wurden die Mittelwerte der beiden Testosteronkonzentrationen jeweils innerhalb einer Zelllinie auf Normalverteilung überprüft und anschließend ein ANOVA-Test durchgeführt um signifikante Unterschiede aufzuzeigen.

[illegible]

[illegible]

b) AR CAG 36 (ORF)

4.2. Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Transfektion des hAR

Zur Auswahl für die Transfektion der erstellten Klone hARCAG18 und hARCAG36 im Expressionsvektor pcDNA6.2EmGFP standen zum Zeitpunkt der Versuche keine humanen Sertoli Zelllinien zur Verfügung. Wir untersuchten die Expression eines AR auf mRNA Ebene in WL3 (Mueller u. Korach, 2001), SK-11 (Sneddon et al. 2005), beides Maus Sertoli Zellen, SCIT-C8 (Konrad et al. 2005), und 93RS2 (Jiang et al. 1997), beides Ratten Sertoli Zelllinien. Es zeigt sich lediglich bei den WL3 und den 93RS2 Zellen kein Signal für einen eigenen AR (Abb. 8). Als Positivkontrolle wurde die cDNA aus Maus – bzw. Rattenhoden verwendet.

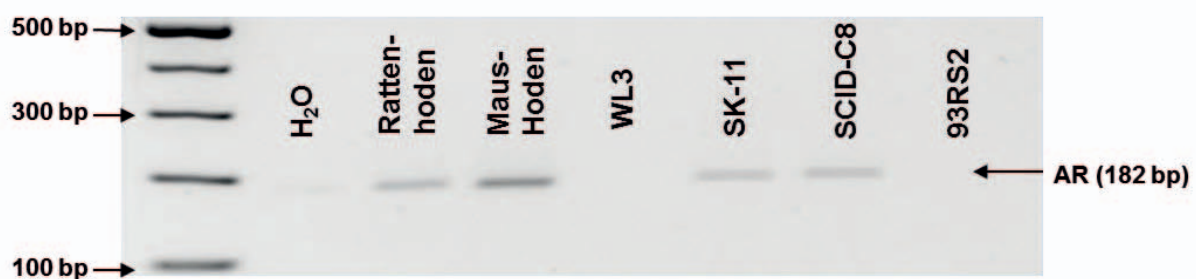


Abb. 8: *SK-11* (Maus-Sertolizellen) und *SCIT-C8* (Ratten-Sertolizellen) exprimieren einen eigenen AR. Bei *WL3* (Maus-Sertolizellen) und *93RS2* (Ratten-Sertolizellen) konnte keine Expression nachgewiesen werden. cDNA aus Ratten- bzw. Maushoden diente als Positiv-, H₂O als Negativkontrolle.

Die Transfektion sollte dann mit den 93RS2 Zellen (Abb. 9 und 10) durchgeführt werden, da nach den PCR Ergebnissen kein störender Hintergrund eines eigenen AR zu erwarten war. Vorversuche mit den unterschiedlichen Zelllinien zeigten die 93RS2 Zellen außerdem bezüglich der Kultivierung (Wachstumsrate, Zellteilung, Anhaftung an den Kulturflaschen, Unempfindlichkeit beim Mediumwechsel und Passagieren), sowie der Kontaminationsanfälligkeit gegenüber den ebenfalls, keinen eigenen AR exprimierenden WL3 Zellen, im Vorteil.

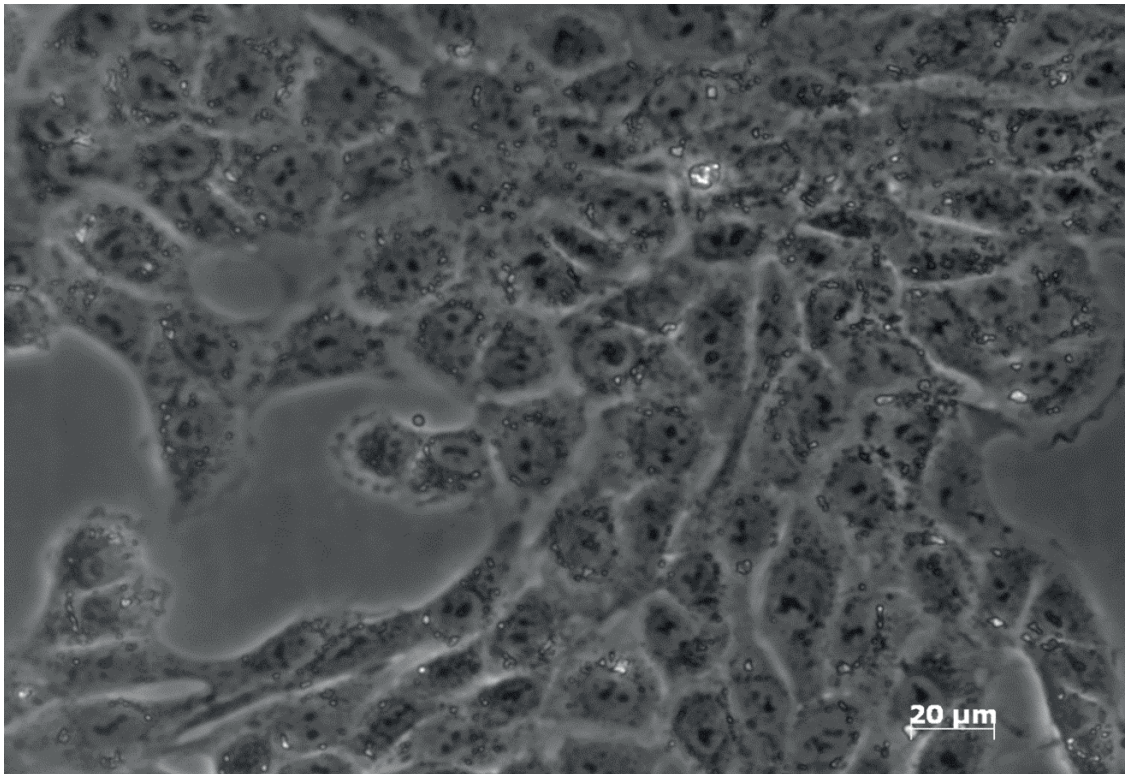


Abb. 9: 93RS2-Zellen in der Zellkultur (Nativpräparat)

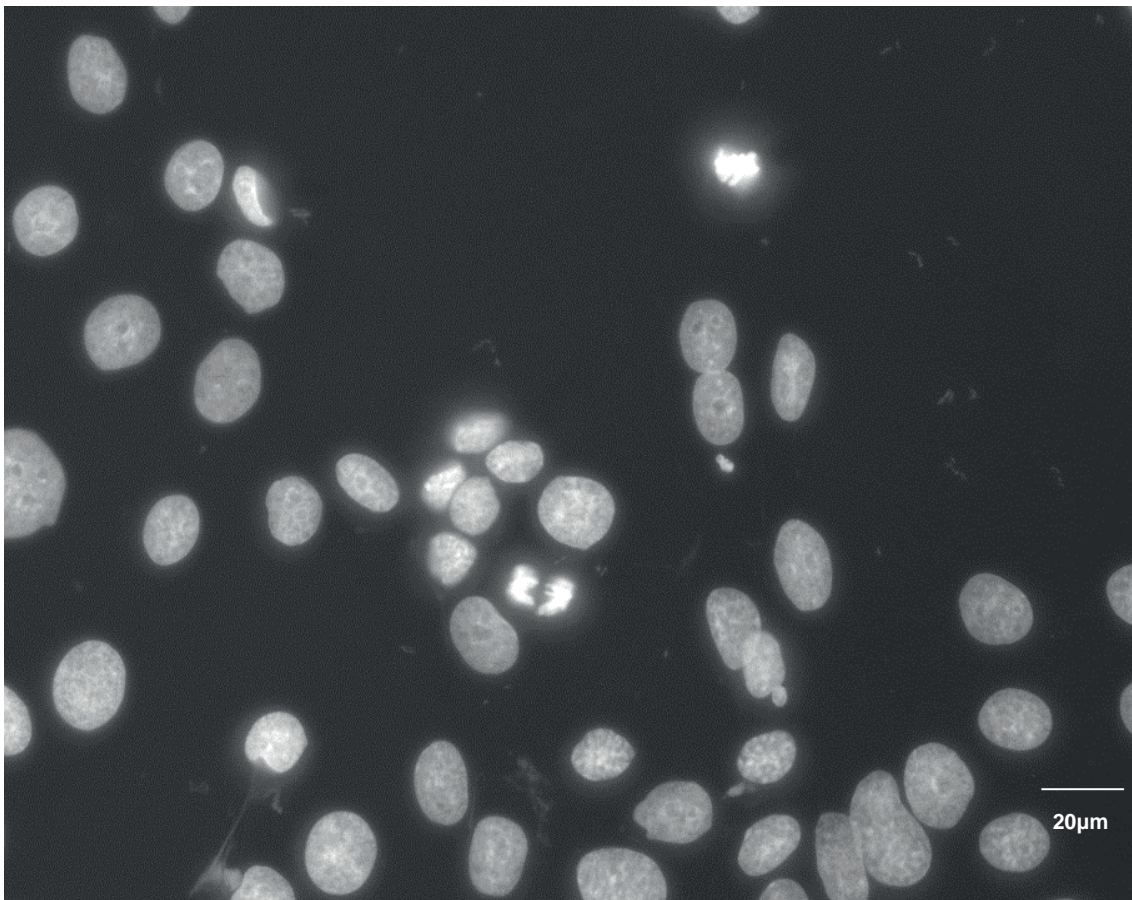


Abb. 10: Zellkerne der 93RS2-Zellen (DAPI-Färbung)

4.3. Charakterisierung von zwei neuen hAR exprimierenden Ratten-Sertoli-Zelllinien (93RShAR18 und 93RShAR36)

Nach der Transfektion konnte der Transfektionserfolg des Fusionsproteins AR/GFP über das grüne Leuchten von GFP (Grün fluoreszierendes Protein) gezeigt werden. Der für die Transfektion benutzte Expressionsvektor trägt c-terminal das GFP. Über dessen Fluoreszenz konnte es nach der Transfektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica) in der Zelle identifiziert werden, siehe Abb. 11 und 12.

Ein zuvor durchgeführter Selektionsversuch (verschiedene Konzentrationen eines bestimmten Antibiotikums werden dem Zellkulturmedium zugesetzt um die Konzentration zu ermitteln, bei der die nativen Zellen absterben) zeigte, dass die untransfizierten 93RS2 Zellen bei einer Blastizidinkonzentration von 5 µg/ml nach 48 Stunden Inkubation vollständig abstarben (Daten nicht aufgeführt). Nach bestätigtem Transfektionserfolg einzelner Zellen über GFP wurde die Antibiotikaselektion mit Blastizidin über 3 Wochen durchgeführt.

Die Transfektion großer Proteine, wie den klonierten AR/GFP-Fusionsproteinen, gestaltete sich sehr schwierig, die Transfektionsrate war sehr gering, so dass es notwendig war vor dem Beginn der Selektion mit Antibiotika optisch den Transfektionserfolg bestimmen zu können. Nur Zellen die den Expressionsvektor aufgenommen hatten, dieser codiert neben GFP auch für die entsprechende Resistenz gegen das Antibiotikum Blastizidin, überlebten. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass alle überlebenden Zellen den transfizierten humanen AR exprimieren. Es wurde bei den positiv transfizierten Zellen keine Selektion auf einen einzigen Klon durchgeführt. Durch die zufällige stabile Integration des hAR in das Genom der Sertolizellen ist der Ort der Integration und damit seine Transkriptionsaktivität nicht vorhersehbar. Durch die Selektion auf alle positiv mit dem hAR transfizierten Zellen, erhielten wir eine biologische Variabilität.

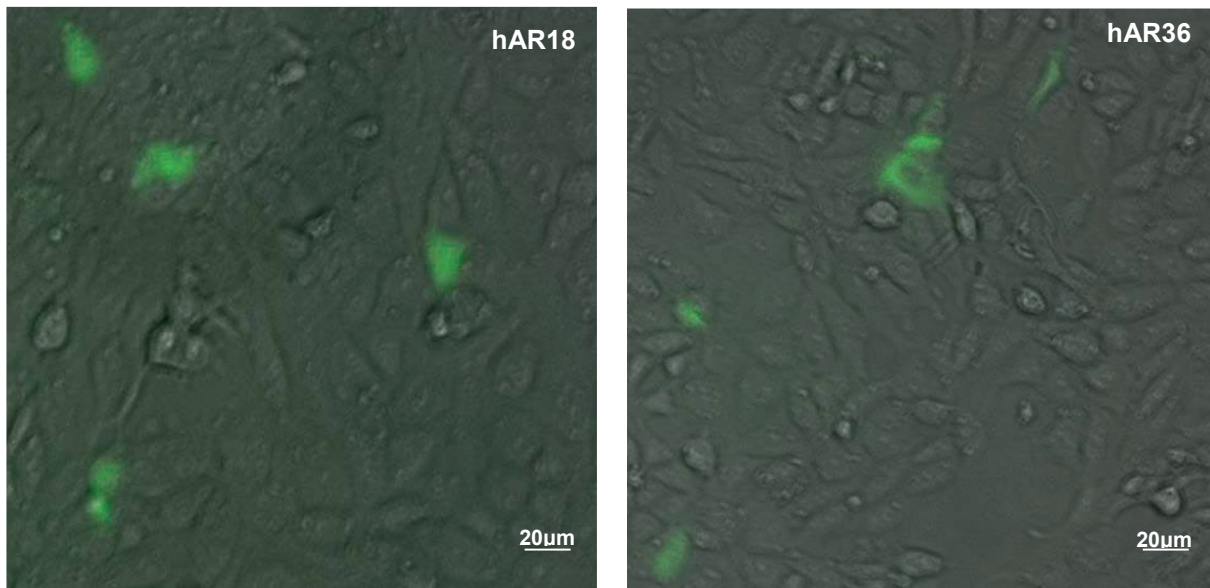


Abb. 11 und 12: 93RS hAR 18 (links) und 93RS hAR 36 (rechts) Nativpräparate zeigen die Eigen-Fluoreszenz des GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die zwei neuen Ratten Sertoli Zelllinien nannten wir **93RS hAR 18** und **93RS hAR 36**.

4.3.1. Immunfluoreszenz

Das GFP des Expressionsvektors zeigte unter der Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop bereits ein grünes Leuchten. Es kann aber dabei nur auf eine positive Transfektion geschlossen werden. Durch einen Antikörper wurde das GFP-Signal nochmals verstärkt um das AR/GFP-Fusionsprotein sowohl im Zytoplasma, als auch in den Zellkernen optisch darstellen zu können. Der verwendete Antikörper gegen das GFP (rb anti GFP (ABCAM, ab290)) markierte dieses sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern wie in Abb. 13; 14; 15 zu sehen. Die untransfizierten 93RS 2 Zellen in Abb. 16 zeigten kein Signal.

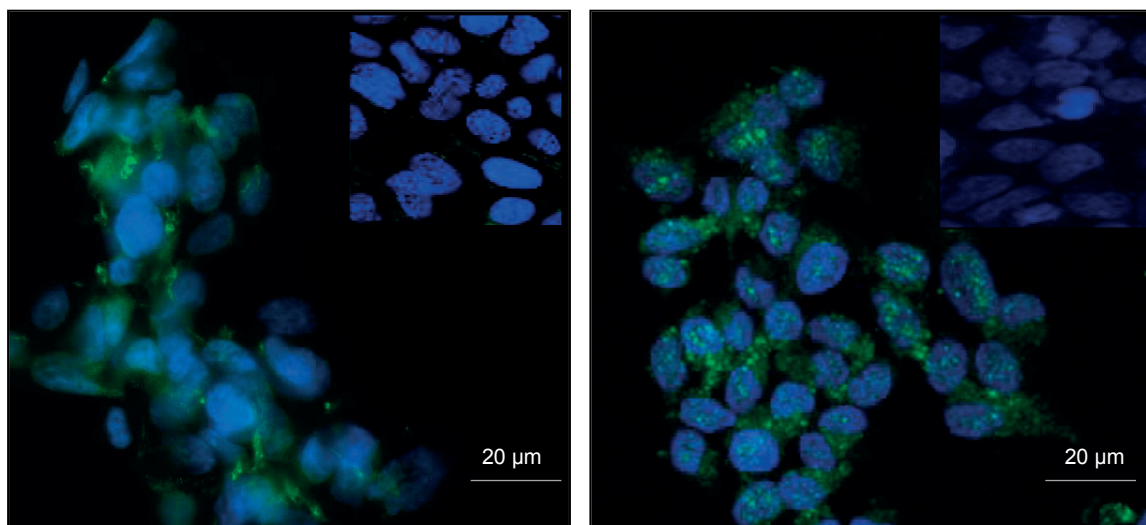


Abb. 13 und 14: Expression von hAR-GFP Konstrukt in 93RS hAR18 (links) und 93RS hAR36 (rechts). Sowohl in den Zellkernen, als auch im Zytoplasma konnte mittels Immunfluoreszenz das AR/GFP-Fusionsprotein und damit der hAR nachgewiesen werden.

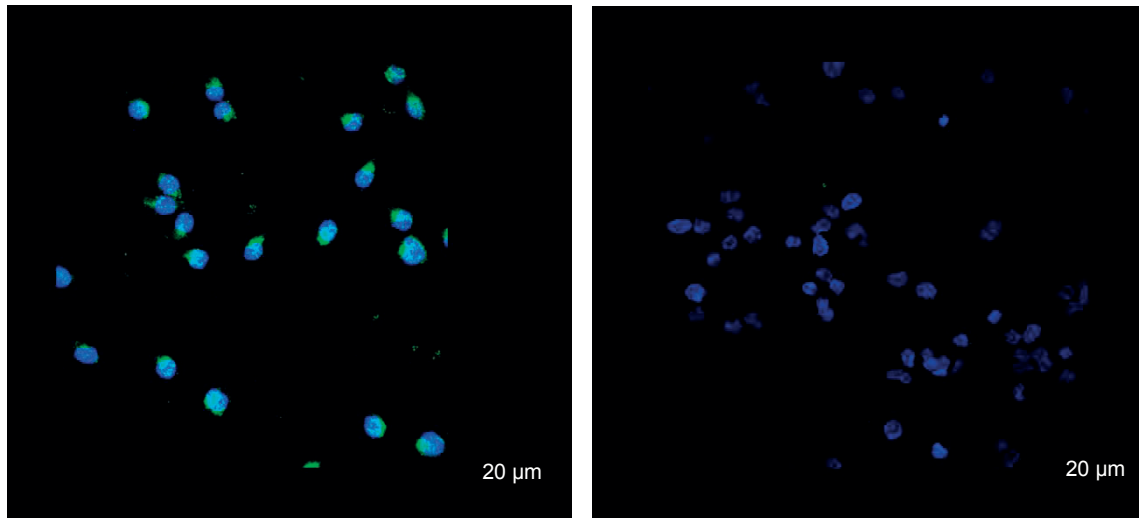


Abb. 15 und 16: Expression des AR/GFP-Fusionsproteins in den Zellkernen von 93RShAR18 (links) und keine Expression eines AR/GFP-Fusionsproteins in den Zellkernen der untransfizierten 93RS2 Zellen (rechts).

4.3.2. Amplifikation des hAR in den transfizierten Zelllinien

Die PCR zum Nachweis des transfizierten humanen AR auf mRNA-Ebene in den beiden generierten Sertoli Zelllinien lieferte ein klares Signal des hAR. Das Amplifikat hat eine Länge von 692 Basenpaaren und bildet einen Teil am n-terminalen Ende des AR ab, wobei dieser in Exon 1 beginnt und in Exon 5 der AR endet. Die untransfizierten 93RS2 Zellen lieferten hingegen kein Signal, siehe Abb. 17. H₂O dient als Negativkontrolle, die cDNA aus dem humanen Hoden als Positivkontrolle.

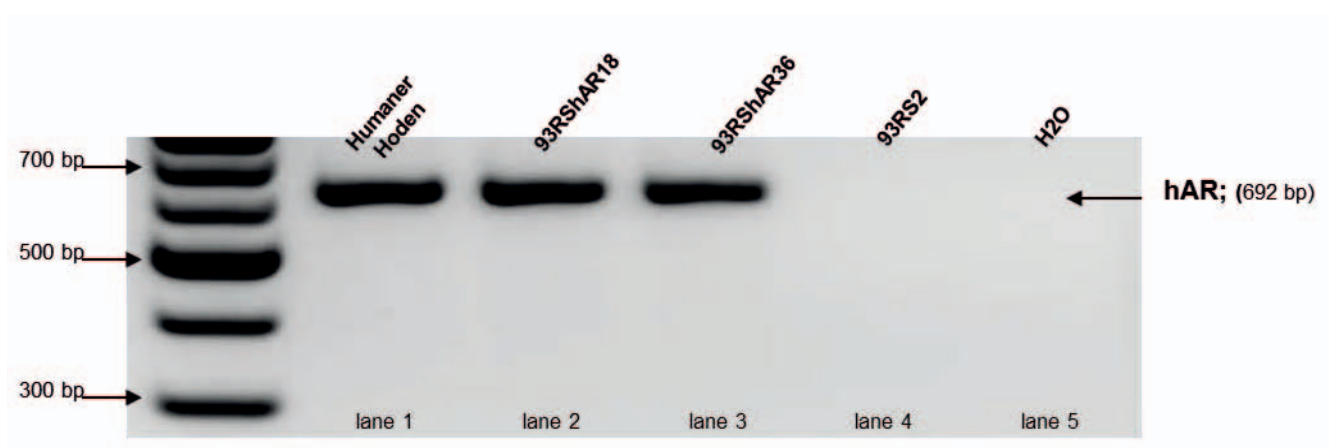


Abb. 17: Nachweis des hAR in den stabil transfizierten Zelllinien auf mRNA-Ebene mit RT-PCR. Lane 2 zeigt ein Signal der hAR in den 93RShAR18 Zellen und Lane 3 in den 93RShAR36 Zellen. Die 93RS2 Zellen, Lane 4, lieferten kein Signal als Positivkontrolle verwendeten wir cDNA aus humanem Hoden, Lane 1, als Negativkontrolle H₂O, Lane 5.

4.3.3. Western Blot

Zum Nachweis des transfizierten humanen AR auf Proteinebene in den beiden Zelllinien wurde ein Western Blot mit einem spezifischen Antikörper für den humanen AR durchgeführt. Das Molekulargewicht eines hAR beträgt 110kDa. Die transfizierten Konstrukte exprimieren am c-terminalen Ende ein GFP, dieses hat ein Molekulargewicht von 26,9 kDa. Somit hat das gesamte Konstrukt ≈ 137 kDa. Als Positivkontrolle diente ein humaner AR (jeweils Lane 2). Beide Zelllinien zeigen eine Bande in erwarteter Größe (jeweils Lane 1). Zur Dokumentation wurden die Ergebnisse digital fotografiert, siehe Abb. 18.

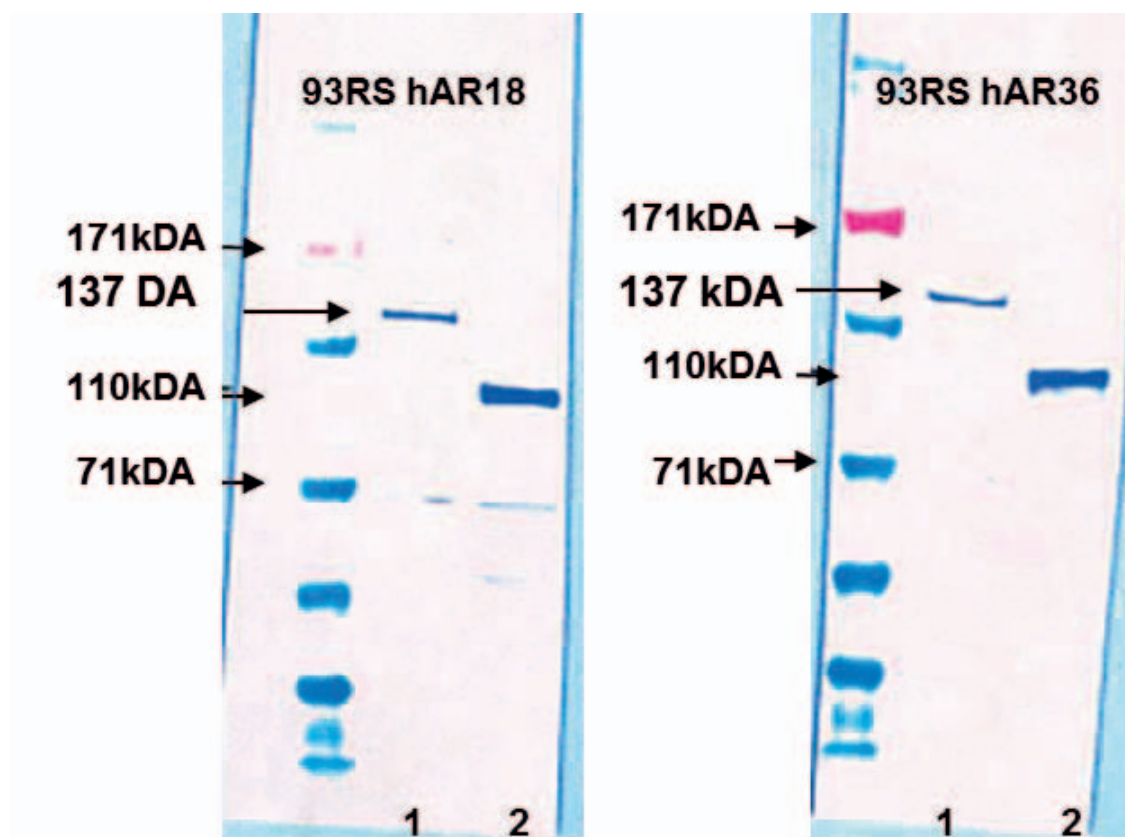


Abb. 18: Nachweis des AR/GFP-Fusionsproteins in den stabil transfizierten Zelllinien auf Protein-Ebene mit Western Blot. Lane 1 zeigt ein Signal des hAR in den 93RShAR18 Zellen (links) und in den 93RShAR36 Zellen ebenfalls auf Lane 1 (rechts) bei jeweils 137 kDa. Das als Positivkontrolle verwendete Protein stammt aus Hodenhomogenat, nach Hodenbiopsie von Patienten mit normaler Spermatogenese (beide jeweils Lane 2), zeigen ein Signal bei 110kDa. Das unterschiedliche Molekulargewicht rührt von der zusätzlichen Masse des GFP (≈ 27 kDa) welches c-terminal an den transfizierten AR-Konstrukten hängt und zusammen ein Fusionsprotein bildet.

4.3.4. Zeitreihe Testosteronstimulation

Alle drei Zelllinien, 93RShAR18, 93RShAR36 und die untransfizierten 93RS2 Zellen, wurden wie in 3.6.2 aufgeführt stimuliert. Es ergaben sich bei optischer Kontrolle unter dem Mikroskop keine Veränderungen bezüglich der Morphologie. Das Zellwachstum veränderte sich nicht und es konnte keine gesteigerte Mortalität festgestellt werden.

4.3.5. Bestimmung der CAG-Repeat-Länge (PAGE-PCR)

Die RT-PCR über den Bereich des CAG-Repeats mit anschließender PAGE (high resolution polyacrylamide gel electrophoresis) zeigten sich Veränderungen in der CAG-Repeat-Länge gegenüber den Ausgangsklonen (Abb. 19). Diese ergaben sich nach Kultivierung der Zelllinien und Stimulation mit Testosteron in den fünf Konzentrationen 10^{-5} M bis 10^{-9} M, gelöst in Ethanol, über 24 h. Alle Stimulationen wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Als Kontrolle diente die Stimulation mit dem für Testosteron als Lösungsmittel verwendeten Ethanol. Es ergaben sich bezüglich der CAG-Repeat-Länge keine Unterschiede zwischen den einzelnen Testosteronkonzentrationen. Die Menge an Testosteron schien somit keinen Einfluß auf die Veränderungen in den CAG-Repeat-Längen gehabt zu haben. Der Verlust von einem, bzw. drei CAG-Repeats scheint bei der reversen Transkription (cDNA-Synthese), in 3.3.3. beschrieben, eingetreten zu sein.

Für die Berechnung der CAG-Repeat-Länge wurde die Laufweite der einzelnen PCR-Produkte mittels einer Eichkurve in die Basenpaarlänge umgerechnet (vgl. Fietz et al. 2011). Für die 93RShAR18 Zellen ergab sich der Verlust von 1 Repeat, für die 93RShAR36 Zellen von 3 Repeats. Für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Zelllinien entsprechend ihrer CAG-Repeat Länge neu in **93RShAR17** und **93RShAR33** umbenannt. Alle weiteren RT-PCR-Experimente wurden mit den auch für die PAGE-PCR eingesetzten, aus drei unabhängigen biologischen Replikaten hergestellten cDNAs durchgeführt.

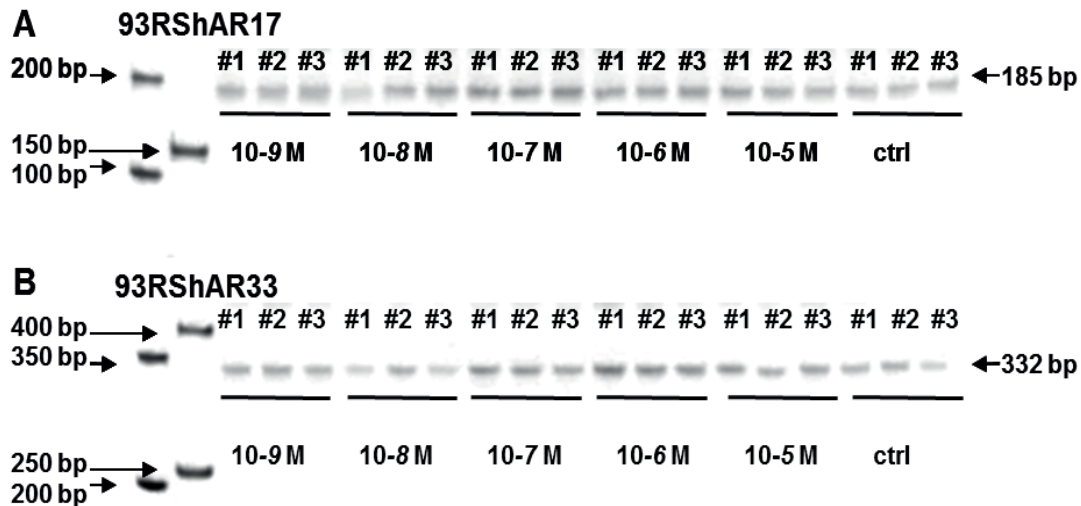


Abb. 19. Bestimmung der CAG-Repeat-Länge des hAR in den 93RShAR17 Zellen (A) und in den 93RShAR33 (B) nach der Stimulation mit Testosteron in fünf verschiedenen Konzentrationen. Jede Zelllinie wurde mit der jeweiligen Testosteronkonzentration in drei unabhängigen biologischen Replikaten stimuliert (#1 bis #3). Nach der Berechnung ergeben sich für die 93RShAR17, 17 CAG-repeats und für die 93RShAR33, 33 CAG-repeats. Als Kontrolle dienten jeweils drei biologische Replikate mit Ethanol.

4.3.6. Housekeeper-Platte

Zur Bestimmung einer endogenen Kontrolle für die Normierung der Stimulationsversuche mit Testosteron, wurde eine RT-qPCR mit einer Housekeeper-Platte durchgeführt. Eine hohe Stimulationskonzentration von 10^{-6} M und eine niedrige von 10^{-9} M sollten Aufschluss darüber geben, bei welchen Genen sich die Expression nach der Testosteronstimulation am wenigsten änderte. Hierfür wurden die Ct-Werte der beiden stimulierten Konzentrationen mit den Ct-Werten der Kontrollen ohne Stimulation mit Testosteron normiert. Die Unterschiede in den Δ Ct-Werten waren bei allen auf der Platte aufgetragenen Genen so gering, dass prinzipiell alle als endogene Kontrolle in Frage kamen. Es wurde daher keine Testosteronabhängigkeit berechnet, sondern die beiden Gene mit dem geringsten Unterschied in der Expression, in Bezug auf die beiden unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen, ausgewählt. Die Gene UBC und Rplp2 wurden zur Normierung für die RT-qPCR auf AR und Clusterin ausgewählt (Abb. 20).

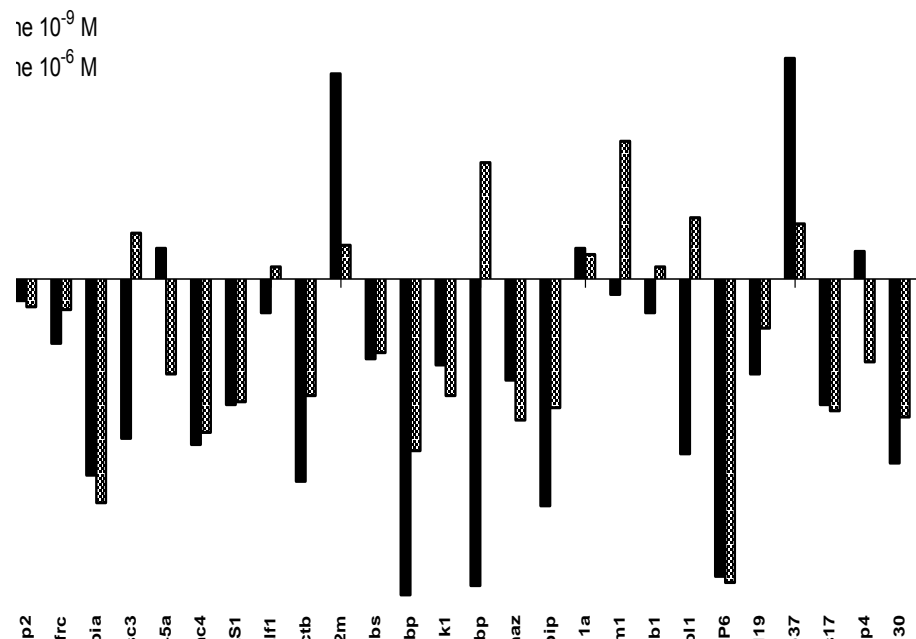


Abb. 20: Auswahl geeigneter Housekeeping-Gene für die Ratte mit RT-qPCR. UBC (1. von links) und Rplp2 (6.von links) zeigten durch die Stimulation mit Testosteron in zwei Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-9} M über 24 h nahezu keine Veränderung in der Genexpression.

4.4. Genexpressionsvergleich testosteronstimulierte Zelllinien

4.4.1. Expression von AR und Clusterin ohne Testosteronstimulation

Zunächst wurde die Expression von AR und Clusterin in allen 3 Zelllinien, 93RS2, 93RShAR17 und 93RShAR33 ermittelt, nachdem diese über 24h nur mit dem Lösungsmittel Ethanol „stimuliert“ wurden. Dies erfolgte um mögliche Unterschiede in der Expression ohne Stimulation mit Testosteron zu erkennen. Normiert wurde, wie auch in allen folgenden RT-qPCR Experimenten über die beiden Housekeeper UBC und Rplp2. Erwartungsgemäß zeigte sich kein Signal für einen hAR in den 93RS2 Zellen. In den beiden transfizierten Zelllinien hingegen konnten wir eine starke, aber vergleichbare, Überexpression nachweisen. Clusterin wird in allen drei Zelllinien nahezu gleich exprimiert (Abb. 21). Sollte es zu einer unterschiedlich starken

Expression von Clusterin in den einzelnen Zelllinien nach Stimulation mit Testosteron kommen, kann eine grundsätzlich stark abweichende Genexpression zwischen den einzelnen Zelllinien als Ursache ausgeschlossen werden. Um zu verifizieren ob die RT-qPCR spezifische PCR-Produkte geliefert hatte, wurden diese zusätzlich auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.6.4.1). Es zeigten sich spezifische PCR-Produkte in erwarteter Größe (Abb. 22).

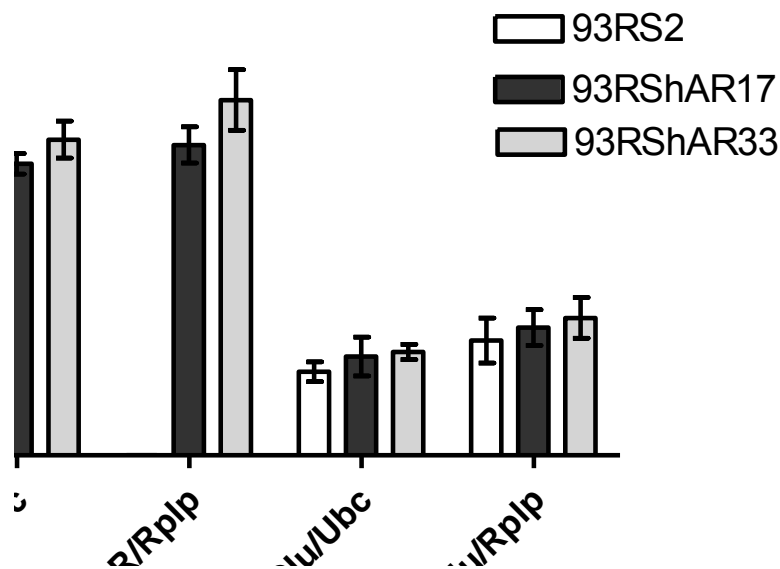


Abb. 21: Expression von AR und Clusterin in den drei Zelllinien 93RS2, 93RShAR17 und 93RShAR33 nach der "Stimulation" mit dem Lösungsmittel Ethanol, ohne Testosteron. In den beiden transfizierten Zelllinien wurde der hAR vergleichbar stark exprimiert, in den 93RS2 gar nicht exprimiert. Clusterin zeigte sich in allen drei Zelllinien nahezu gleich exprimiert.

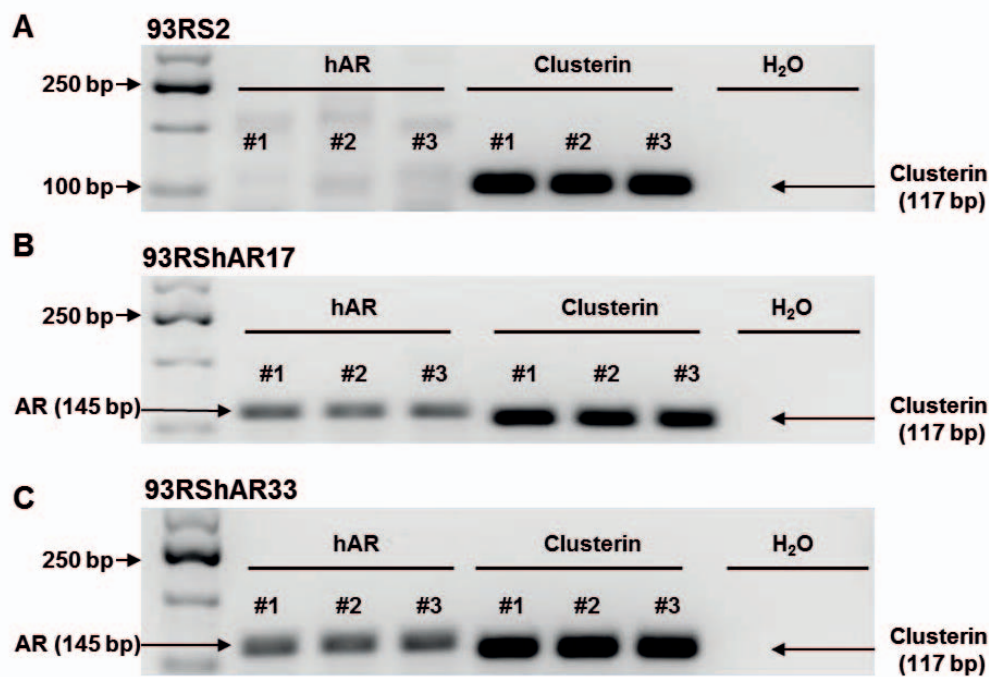


Abb. 22: PCR-Produkte der RT-qPCR von AR und Clusterin in den drei Zelllinien 93RS2, 93RShAR17 und 93RShAR33 in der Elektrophorese. Aufgetragen wurden jeweils 3 unabhängige biologische Replikate (#1 bis #3). Die 93RS2 Zellen (A) zeigten ein spezifisches Clusterin PCR-Produkt, kein Signal beim AR. Die 93RShAR17(B) und die 93RShAR33(C) Zellen zeigten ein spezifisches PCR Produkt sowohl für den AR, als auch für Clusterin. H₂O diente als Negativkontrolle.

4.4.2. Expressionsvergleich unter Testosteronstimulation

Die Stimulation erfolgte für alle Zelllinien über 24 bzw. 48 Stunden mit den Testosteronkonzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-9} M. Es ergaben sich diesbezüglich keine Unterschiede. Daher werden nur die Daten der Stimulation über 24 Stunden gezeigt. Alle Versuche wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate durchgeführt. Jeder Versuch wurde außerdem dreifach technisch repliziert. Die gezeigten Graphen stellen jeweils ein technisches Replikat da, da es nur minimale Abweichungen in den Ct-Werten gab, wurde auf die Bildung von Mittelwerten zwischen den technischen Replikaten verzichtet. Die Expression des AR zeigte im Vergleich der beiden Zelllinien 93RShAR17 und 93RShAR33 keinen Unterschied. Die Unterschiede in der Genexpression von Clusterin waren sehr gering, so dass hier die Ct-Werte aufgetragen wurden. Die Expression von Clusterin zeigte sich bei den 93RShAR17-Zellen bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-6} M und 10^{-7} M verändert (siehe Abb. 23), bei den 93RShAR33-Zellen bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-6} M (siehe Abb. 24).

Die 93RS2 Zellen zeigten keine Unterschiede in der Regulation von Clusterin (siehe Abb. 25). Die leichten Unterschiede in der Genexpression für Clu in den beiden Zelllinien lieferten den Hinweis, mit welchen Konzentrationen in weiteren Versuchen gearbeitet werden konnte.

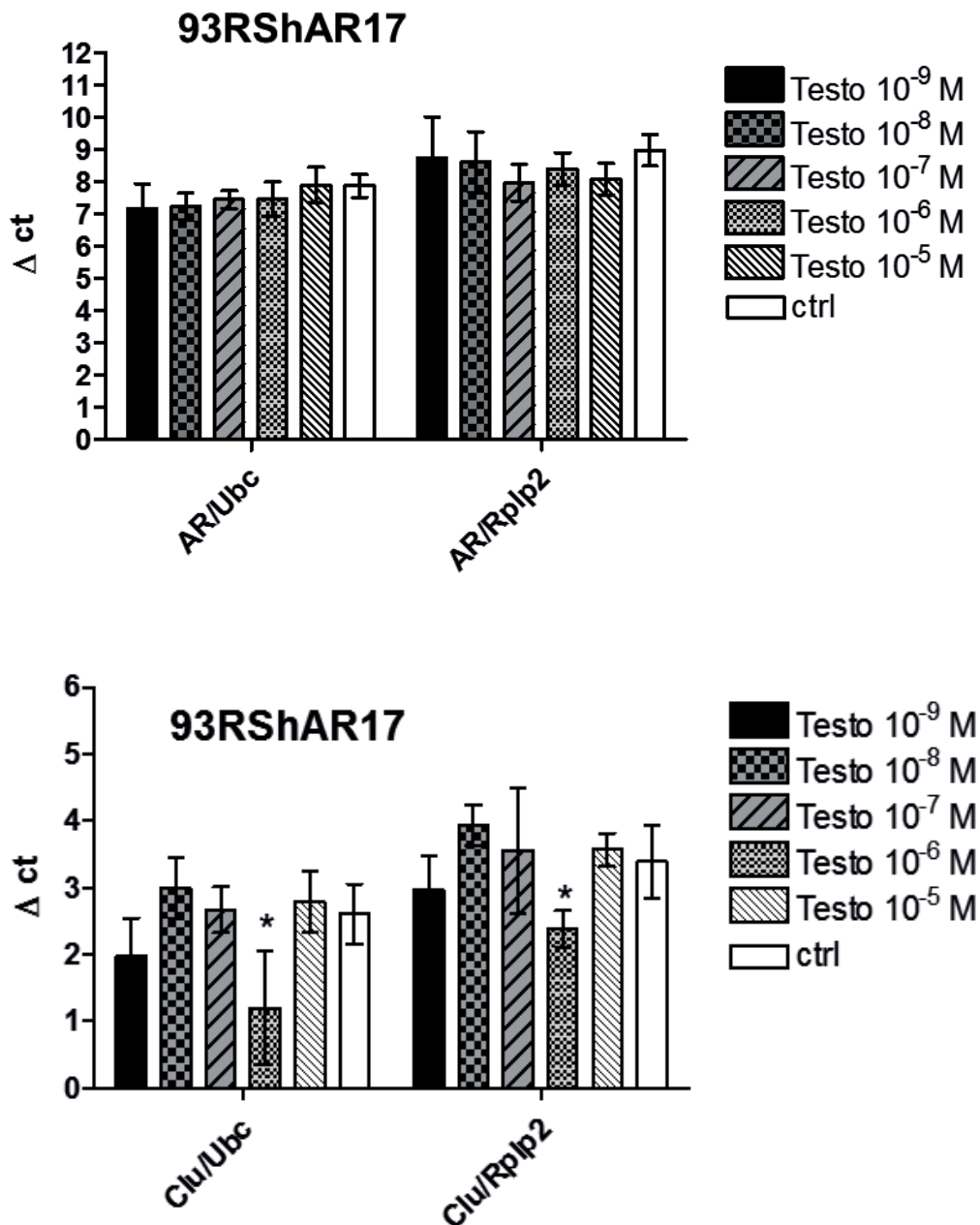


Abb. 23: Expression von AR (oben) und Clusterin (unten) in 93RShAR17 Zellen nach Stimulation mit Testosteron für 24h in den Konzentrationen 10⁻⁵M bis 10⁻⁹M. Der AR zeigte keine Unterschiede in der Expression, bei Clusterin zeigten sich bei den Testosteronkonzentrationen von 10⁻⁶M (*) und 10⁻⁷M die stärksten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Als Kontrolle diente die "Stimulation" mit dem Lösungsmittel Ethanol ohne Testosteron.

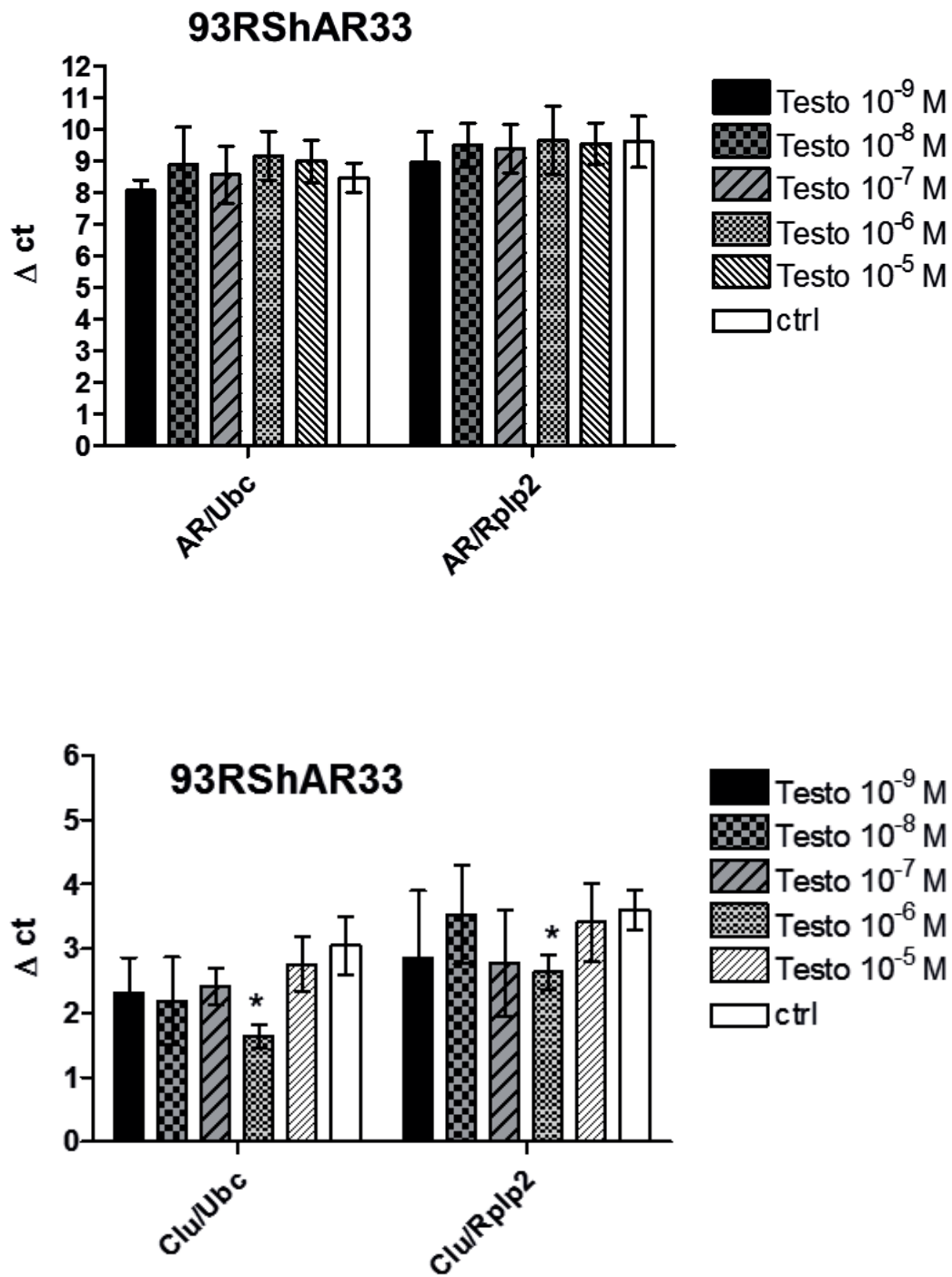


Abb. 24: Expression von AR (oben) und Clusterin (unten) in 93RShA33 Zellen nach Stimulation mit Testosteron für 24h in den Konzentrationen 10⁻⁵M bis 10⁻⁹M. Der AR zeigt keine Unterschiede in der Expression, bei Clusterin zeigten sich lediglich bei der Testosteronkonzentration von 10⁻⁶ (*) Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Als Kontrolle diente die "Stimulation" mit dem Lösungsmittel Ethanol ohne Testosteron.

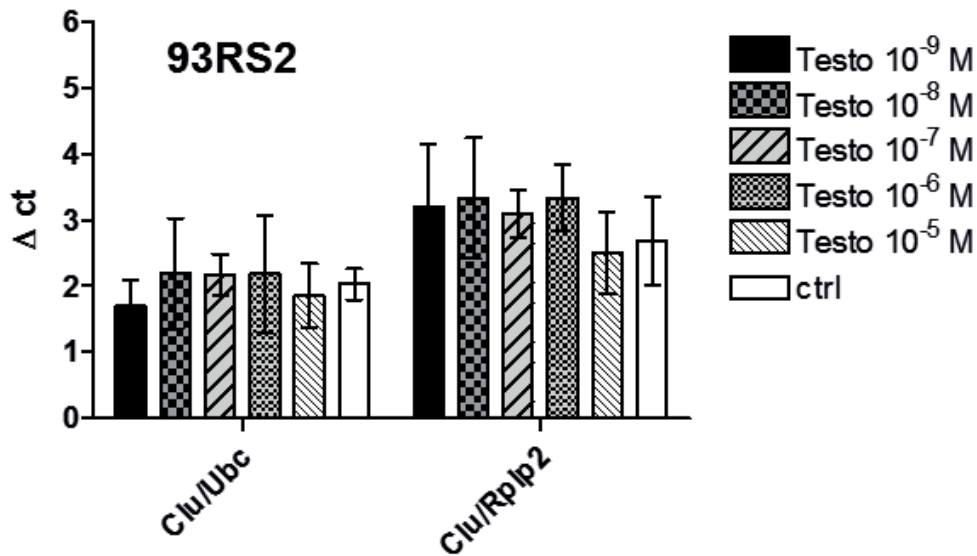


Abb. 25: Expression von Clusterin in 93RS2 Zellen nach Stimulation mit Testosteron für 24 h in den Konzentrationen 10^{-5} M bis 10^{-9} M. Es zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede in der Expression von Clusterin. Als Kontrolle diente die "Stimulation" mit dem Lösungsmittel Ethanol ohne Testosteron.

Da sich lediglich bei der Stimulation mit Testosteron in der Konzentration von 10^{-6} M bei beiden Zelllinien erkennbare Unterschiede in der Genexpression von Clusterin zeigten, wurde die Stimulationsdauer mit Testosteron verändert. Diese wurde auf 1, 2 und 8 Stunden beschränkt, um einen sich während der langen Stimulationsdauer wieder aufhebenden Effekt erkennen zu können. Diese Stimulation führten bei der Expression des AR wie erwartet zu keinerlei Veränderungen (siehe Abb. 26). Für Clusterin ergab sich lediglich bei der Stimulation über 1 Stunde eine leichte Veränderung (siehe Abb. 26) Die Daten von 2 und 8 Stunden werden nicht gezeigt, da dort keine Effekte erkannt werden konnten. Die Unterschiede in der Expression waren allerdings schon bei den Ct-Werten sehr gering, so dass auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde. Die Ergebnisse der RT-qPCR konnten lediglich als Entscheidungshilfe in Bezug auf die zu untersuchenden Stimulationskonzentrationen für weitere Versuche dienen.

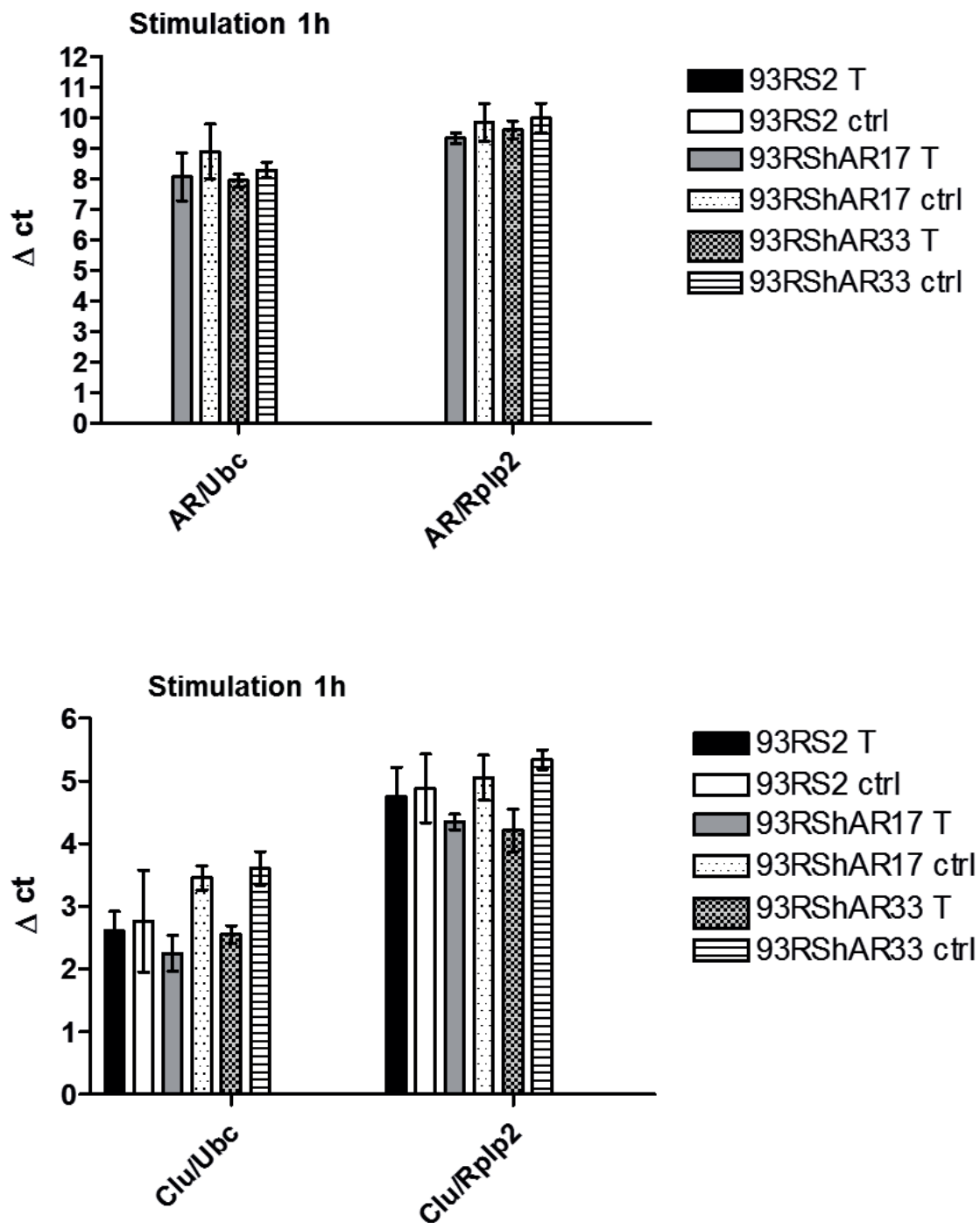


Abb. 26: Expression von AR (**oben**) und Clusterin (**unten**) in allen 3 Zelllinien nach Stimulation mit Testosteron in der Konzentration von 10^{-6} M über 1 h. Bei 93RS2 (links) keine Expression, bei 93RShAR17 (Mitte) und bei 93RShAR33 (rechts) keine Änderung in der Expression. Clusterin zeigte in den 93RS2 Zellen (links) im Vergleich zur Kontrolle keine veränderte Expression von Clusterin. Die 93RShAR17 (Mitte) und die 93RShAR 33 (rechts) zeigten eine geringe Veränderung in der Expression von Clusterin.

4.4.3. ELISA

Zur Untersuchung der Regulation von Clusterin nach Stimulation mit Testosteron auf Proteinebene wurde ein ELISA durchgeführt. In den vorangegangenen RT-qPCR-Versuchen zeigte sich eine geringfügige Veränderung der Genexpression lediglich bei den Testosteronkonzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-7} M bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden und 1 Stunde. Die Extraktion der Proteine erfolgte aus Zellen die über 48 Stunden mit den Testosteronkonzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M, wie in 3.6 beschrieben, stimuliert wurden. Da sich in Vorversuchen zur Proteinextraktion aus den Setoli-Zellen gezeigt hatte, dass eine messbare Proteinkonzentration teilweise erst nach etwa 48 h zu erzielen war. Es wurden drei unabhängige biologische Replikate in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Der ELISA wurde mit denselben Ansätzen (N1-N3) für jede Zelllinie durchgeführt, aus denen auch die RNA stammt, die nach cDNA-Synthese, für die RT-qPCR-Versuche eingesetzt wurden.

Es konnte eine veränderte Proteinkonzentration (ng/ml) bei beiden Stimulationskonzentrationen (10^{-6} M und 10^{-7} M) im Vergleich zwischen den transfizierten Zelllinien 93RShAR17 und den untransfizierten 93RS2, den transfizierten 93RShAR33 und den untransfizierten 93RS2, als auch zwischen den transfizierten 93RShAR17 und 93RShAR33 gemessen werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (siehe Abb. 27). Im Vergleich der beiden Stimulationskonzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M innerhalb jeweils einer Zelllinie, stellte sich bei den 93RShAR17 kein signifikanter Unterschied in der gemessenen Proteinkonzentration von Clusterin ein. Beim Vergleich der Proteinkonzentrationen innerhalb der 93RS2 und der 93RShAR33 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen gezeigt werden. Beide transfizierten Zelllinien zeigten eine signifikant veränderte Proteinkonzentration im Vergleich zu den untransfizierten 93RS2-Zellen. Diese Effekte sind aber in Bezug auf die tatsächlich gemessenen Konzentrationen an Clusterin (ng/ml) gering, so dass sie auch in Bezug auf dieses in vitro Modell als nicht biologisch relevant eingestuft werden müssen. Es kann hier eher von einem tendenziellen Effekt gesprochen werden, der sich in der RT-qPCR mit den leichten Unterschieden in der Genexpression von Clusterin bei einer Stimulationskonzentration von 10^{-6} M Testosteron andeutete. Eine explizit veränderte Regulation von Clusterin als mögliche Folge einer unterschiedlichen CAG-Repeat-Länge der transfizierten ARs konnte nicht gezeigt werden.

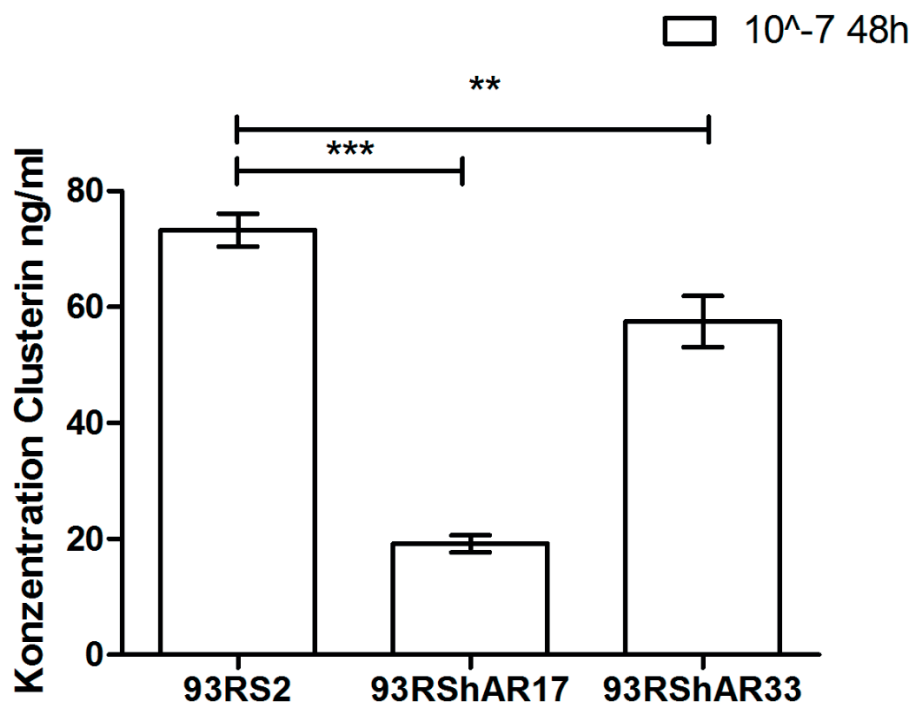
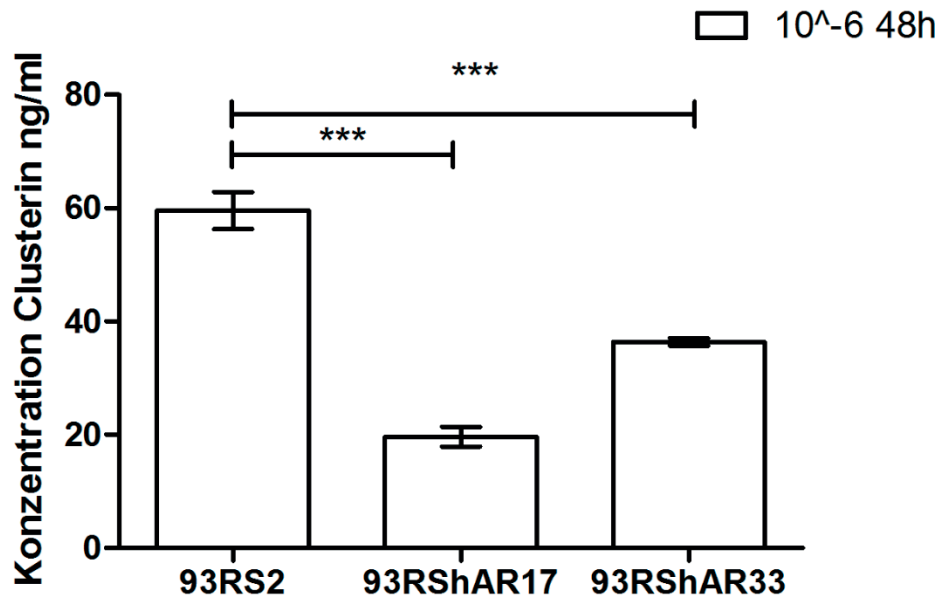


Abb.27: Proteinkonzentration (ng/ml) von Clusterin in den Sertoli-Zelllinien 93RS2, 93RShAR17 und 93RShAR33 nach 48 h Stimulation mit Testosteron in den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M. Aufgetragen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten ermittelt in 3 unterschiedlichen Versuchen. Die Unterschiede in der Proteinkonzentration von Clusterin zeigten sich im Vergleich zwischen den 93RShAR17 und den 93RS2, den 93RShAR33 und den 93RS2, sowie den 93RShAR17 und den 93RShAR33 bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-6} M (oben) und 10^{-7} M (unten) als statistisch signifikant. Aufgrund der geringen Konzentrationsunterschiede zwischen untransfizierten (93RS2) und transfizierten (93RShAR17 und 93RShAR33) Zellen, konnte nicht auf eine biologische Relevanz geschlossen werden.

5. Diskussion

Sertoli-Zellen sind für den Ablauf einer physiologischen Spermatogenese unerlässlich (Griswold 1998), da sie als „Ammenzellen“ eine Vielzahl von Aufgaben im Keimtubulus übernehmen. Die Sertoli-Zellen exprimieren ein Protein, den AR, der als Ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor fungiert und die Wirkung von Testosteron und Dihydrotestosteron vermittelt (Collins et al. 2003). Über den AR wird dann die Expression nachgeschalteter Gene reguliert. Die Bedeutung des AR für die männliche Geschlechtsentwicklung und für die Spermatogenese zeigten u.a. O'Shaughnessy et al. (2002) anhand einer Studie mit AR Knock-Out-Mäusen. Das AR-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Brown et al. 1989) und zeigt auf Exon eins eine polymorphe Trinucleotidsequenz, das CAG-Repeat. Diese Trinukleotidsequenz hat physiologisch eine mittlere Länge von 21 ± 2 (Quigley et al. 1995), mit einer Spanne zwischen 9 und 36 (Andrew et al. 1997). Trinucleotiderkrankungen wie die Huntington-Disease (Moe et al. 2008) oder die Kennedys-Disease (La Sprada et al. 1991) gehen unter anderem mit einer starken Verlängerung des CAG-Repeats einher.

Untersuchungen zur Replikation des CAG-Repeats wurden in der Vergangenheit zumeist an Bakterien durchgeführt und es zeigten sich immer wieder Veränderungen in der Länge nach Replikation und Transfektion. Die Ursache hierfür scheinen die Bildung von sogenannten Loops und oder Hairpins zu sein, die die Replikation durch die Polymerasen erheblich erschweren, beziehungsweise stören (Richards u. Sutherland 1994; Yu u. Mitas 1995; Pearson u. Sinden 1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurden drei humane AR Klone mit einer definierten CAG-Repeat-Länge von CAG 14, CAG 18 und CAG 36 erstellt. Es zeigte sich in mehreren Sequenzierungen, dass besonders bei dem langen CAG-Repeat (36 Repeats) während der Klonierung mittels E.coli Bakterien, immer wieder einzelne Repeats „verloren“ gingen. Dass bei einer Klonierung kleinere Fehler, also Veränderungen einzelner Basen, im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz durchaus auftreten, ist schon lange bekannt (Scharf et al. 1986). Speziell bei E. coli konnte gezeigt werden, dass Arginin eine relativ seltene Aminosäure ist und es bei der Translation sehr leicht zu einem falschen Ablesen von CGG und CAG kommen kann (McNulty et al. 2003). Dies scheint somit bei allen Klonierungen mit Hilfe von E. coli-Bakterien und den entsprechenden Sequenzen wahrscheinlich. Es erfolgte daher eine Sequenzierung der Klone vor jedem neuen Versuchsansatz, wenn eine Passage über E. coli-Bakterien durchgeführt wurde.

Um die möglichen Auswirkungen eines langen oder kurzen CAG-Repeats auf die Regulation des androgen-regulierten und damit testosteronabhängigen Gens Clusterin untersuchen zu können, mussten die Klone in Zellen transfiziert werden, die dieses Gen auch exprimieren. Für diese Fragestellung wurden immortalisierte Ratten Sertoli-Zellen ausgewählt, da zu Beginn der Arbeit keine immortalisierte humane Sertoli-Zelllinie mit den entsprechenden Eigenschaften zur Verfügung stand. Die zur Transfektion mit den AR-Klonen 18 und 36 ausgewählten Sertoli-Zellen der immortalisierten Zelllinie 93RS2 (Jiang et al. 1997) stammen von 19 Tage alten Ratten. Weder aus den 93RS2, noch aus den von Mäusen stammenden WL3 Zellen (Mueller u. Korach 2001) ließ sich in Vorversuchen ein eigener AR amplifizieren. In eigenen Vorversuchen zur Kultivierung der Zellen (Wachstumsrate, Zellteilung, Anhaftung an den Kulturflaschen, Unempfindlichkeit beim Mediumwechsel und Passagieren; Daten nicht gezeigt) erwiesen sich die 93RS2 gegenüber den WL3 allerdings im Vorteil. In den SCIT-C8-Zellen konnte ein eigener AR mittels RT-PCR deutlich nachgewiesen werden, obwohl die Autoren (Konrad et al. 2004) das Signal eines eigenen AR als nur sehr schwach bezeichneten. Die Expression eines AR konnte bei Ratten von Bremner et al. (1994) bereits ab Lebenstag fünf nachgewiesen werden. Da in den 93RS2 keinerlei Signal für einen eigenen AR detektiert werden konnte, war davon auszugehen, dass eine Beeinflussung des transfizierten AR durch einen bereits vorhandenen AR nahezu ausgeschlossen, beziehungsweise als nicht relevant angesehen werden kann.

Bezüglich der speziesübergreifenden Transfektion, das heißt des humanen Proteins AR in eine Ratten-Sertoli-Zelle, sind keine substantiellen Transaktivierungsfehler zu erwarten, da die Sequenzen der beiden Proteine hAR (humaner AR) und rAR (Ratten AR) fast identisch sind. Konkret zeigten sie sich im Sequenzvergleich die für die geplanten Stimulationsversuche entscheidenden Bereiche, die DNA- und die Liganden-Bindungs-Domäne, als sequentiell völlig identisch (Chang et al. 1988).

Transfiziert wurden die AR Konstrukte hAR18 und hAR36 in dem Expressionsvektor pcDNA 6.2 C-EmGFP (Invitrogen), dieser besitzt c-terminal ein GFP (Green fluorescent protein). Dieses GFP ist nötig, um nach erfolgter Transfektion die Zellen optisch auf positive Transfektion detektieren und dann weiter unter Antibiotika-Selektion kultivieren zu können. Aufgrund der Größe des GFP kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass dieses die Transaktivierungsfunktion des transfizierten humanen AR beeinflusst. Im Vergleich mit den nativen 93RS2-Zellen konnten nach

Transfektion mit dem Expressionsvektor aber keine Anzeichen für einen veränderten Phänotyp oder veränderte Kultureigenschaften, wie etwa frühzeitiges Ablösen von der Kulturflasche oder verlangsamte Wachstumsrate, beobachtet werden.

Zur Transfektion der klonierten beiden AR/GFP-Fusionsproteine gibt es mehrere Methoden. Eine Methode ist die Calciumphosphat-Transfektion, bei der die Plasmid-DNA an Calciumphosphatkristalle gebunden und von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden kann (Chen u. Okayama 1987; Jordan u. Wurm 2004). Eine ähnliche Methode ist die DEAE-Dextran-Transfektion, die Plasmid-DNA wird zunächst mittels DEAE-Dextran präzipitiert und dann ebenfalls durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen (Lopata et al. 1984; Takai u. Ohmori 1990). Eine weitere Transfektionsmethode stellt die Lipofektion da. Hierfür verwendet man kationische Lipide, die an die zu transfizierende Plasmid-DNA binden und diese in die Zellen einschleusen (Felgner et al. 1987; Rose et al. 1991).

In dieser Arbeit wurde die Transfektion mittels Elektroporation durchgeführt, hierfür wird den Zellen in einer Plasmid-DNA-haltigen Lösung ein Stromstoß versetzt, wodurch sich in der Zellmembran temporäre Poren öffnen. Durch diese temporären Poren kann die Plasmid-DNA dann in die Zellen gelangen (Neumann et al. 1982, Sukharev et al. 1994).

Nach erfolgter Transfektion zeigten die beiden Zelllinien 93RShAR18 und 93RShAR36 keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu den ursprünglichen 93RS2 Zellen. In Bezug auf die Kultivierungseigenschaften ergaben sich keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Zellen durch die Transfektion. Kultiviert wurden die Zellen bei 34 ° Celsius um eine schnellere Wachstumsrate zu erhalten, Jiang et al. (1997) kultivierten ihre Zellen bei 32° Celsius. Eine Temperatur von 34° Celsius sorgt aber nicht nur für ein schnelleres Wachstum der Zellen, sondern orientiert sich an den *in Vivo*-Bedingungen adulter Ratten. Im Hoden adulter Ratten ist die Temperatur im Hoden etwa 3-3,5 ° Celsius niedriger als die mittlere Rektaltemperatur von 37° Celsius, wobei diese Temperaturdifferenz geringer ausfällt, je jünger die Ratten sind. Die Temperatur von 33,5 bis 34 ° Celsius scheint mit einer funktionellen Reife des Keimtubulus assoziiert zu sein (Kormano 1967). Daher sollten auch *in Vitro* keine negativen Auswirkungen bezüglich der Genexpression eintreten.

Es ist seit langem bekannt, dass bei der Replikation von DNA-Abschnitten mittels PCR Lesefehler entstehen. Diese sind von mehreren Faktoren, wie der verwendeten

Polymerase, dem Puffer, der Anzahl der Zyklen, aber auch der zu replizierenden Sequenz abhängig. Allerdings scheint bei der PCR auch der verwendeten Polymerasen eine große Bedeutung in Bezug auf die Lesefehlerhäufigkeit zuzukommen (Cline et al. 1996).

Es ist daher wahrscheinlich, dass Lesefehler, sowohl in den Bakterienzellen, aber auch in den transfizierten Zellen auftreten, da für deren DNA-Replikation ja ebenfalls Polymerasen verantwortlich sind. Lesefehler speziell bei der Replikation von repetitiven Sequenzen wie dem CAG-Repeat, ergeben sich oftmals durch die starken Wasserstoffbrückenbindungen, wie sie zwischen den Basen Guanin und Cytosin bestehen. Diese Anziehungskräfte können zur Bildung von *hairpins* und *loops* führen, die dann ein fehlerfreies Ablesen der DNA durch die Polymerasen erschweren, oder verhindern (Yu et al. 1995; Schimizu et al. 1996; Pearson u. Sinden 1998). Es ist nicht selten, dass auch einzelne oder mehrere Triplets verschwinden. Daher wurde nach Stimulation mit Testosteron eine SDS-PAGE-PCR durchgeführt um die genaue CAG-Repeat-Länge zu bestimmen.

Bei den 93RShAR18 Zellen zeigte die SDS-PAGE-PCR den Verlust eines Basenpaares, bei den 93RShAR36 Zellen den Verlust von 3 Basenpaaren. Diese Zellen wurden entsprechend ihrer CAG-Repeat-Länge 93RShAR17 und 93RShAR33 benannt. Die zu untersuchenden CAG-Repeats stammen alle aus einer Sertoli-Zellpopulation. Unterschiede in der CAG-Repeat-Länge, nicht nur zwischen Blut-DNA und Hodengewebe, sondern auch innerhalb der einzelnen Zellpopulationen konnten von Fietz et. al (2011) gezeigt werden. In den beiden Sertoli-Zellsystemen, mit der Expression von hAR17 und hAR33, konnte dies nicht beobachtet werden. Eine Begründung hierfür konnte nicht gefunden werden.

Obwohl sich die CAG-Repeat-Länge der beiden Zelllinien innerhalb der angegebenen physiologischen Varianz von 9 bis 36 (Andrew et al. 1997) deutlich unterscheidet, konnten praktisch keine Unterschiede in der mRNA-Expression des AR gefunden werden. In den 93RShAR33 Zellen gibt es unter den verschiedenen Testosteronkonzentrationen eine minimale Variation in der mRNA-Expression des hAR, die nach meiner Meinung aber keinen Effekt auf die Expression von nachgeschalteten Genen haben kann. Diese Annahme wird gestützt von Shan et al. 1997, die in einer Studie zeigten, dass eine Behandlung mit Androgenen bei Sertoli-Zellen von 21 Tage alten Ratten keinen Effekt auf die mRNA-Expression des AR hat.

Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Behandlung mit Androgenen bei Sertoli-Zellen von 35- 90 Tage alten Ratten zu einer herabgesetzten Expression des AR führen kann. Die 93RS Zellen stammen von 19 Tage alten Ratten, daher können diese minimalen Schwankungen mit einer biologischen Varianz erklärt werden. Es wurde nach der Transfektion bewusst auf die Kultivierung nur eines einzelnen Zellklones verzichtet, um die Eigenschaften sämtlicher den hAR exprimierenden Sertolizellen zu untersuchen. Unterschiede in der Expression sollten so ausgeglichen und deren Effekte minimiert werden.

Stellvertretend für AR abhängige Zielgene wurde die Expression von Clusterin (SGP-2) sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Die Expression von Clusterin wird in diversen Geweben nachgewiesen. Die Funktionen haben eine große Bandbreite, die vom Lipidtransport über die Spermienreifung, die Initiation der Apoptose, der Protektion von Membranen bis hin zur Vermittlung von Zell- zu Zell-Interaktionen reicht (Rosenberg u. Silikensen 1995). Clusterin wird außerdem als ein Marker für die Reifung der Sertoli-Zellen angesehen. Die Expression steigt bei Ratten in einem Alter von 10 bis 20 Tagen stark an und ist danach gleichbleibend (Plotton et al. 2005). Eine Veränderung der Genexpressionslevel generell kann zu einer verzögerten oder teilweise ausbleibenden Reifung der Sertoli-Zellen und damit zu herabgesetzter oder nicht vollständig ablaufender Spermatogenese führen (Morales et al. 1987). Aus diesem Grund erscheint das Gen Clusterin, da für die Sertoli-Zellreifung mit verantwortlich, als guter Marker für diese Untersuchungen. Die Regulation von Clusterin ist nicht vollständig verstanden, diese scheint aber maßgeblich über Sexualhormone bestimmt zu sein, so konnte von Wünsche et al. (1998) eine Regulation über Östrogen festgestellt werden. Heikaus et al. zeigten 2002 die Ansprechbarkeit von einigen Genen wie Connexin 43, Connexin 26 und Clusterin für Östrogene, aber auch für Östrogenrezeptormodulatoren und Phytoöstrogene. In epithelialen Zellen der Prostata konnte über Chromatin-Immunpräzipitation eine direkte Interaktion des AR mit einer regulatorisch wichtigen Region auf den Clusterin-Gen nachgewiesen werden, die die Transkription von Clusterin erhöht (Cochrane et al. 2007). Daher gehen einige Autoren davon aus, dass die Regulation von Clusterin maßgeblich über den AR erfolgt (Wong et al. 1994; Rosemblyt u. Chen 1994). Obwohl die Regulation der Expression von Clusterin nicht vollständig verstanden ist, scheint eine Beeinflussung durch Steroidhormone, gewebeabhängig, vermittelt über AR oder ER (Östrogenrezeptor) unstrittig. Es konnte in den 93RShAR17 und 93RShAR33 nach

Stimulation mit Testosteron in den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M eine leichte Veränderung in der Expression gezeigt werden, wobei sich die Expression des AR nicht nennenswert veränderte. Ob diese Veränderung in der Genexpression von Clusterin aber als dosisabhängig bezeichnet werden kann, ist nicht klar. Diese Veränderung der Clusterinexpression, respektive deren Runterregulation durch Testosteron ist nach wie vor in der Diskussion. Betuzzi et al. fanden bereits 1989 eine von Androgenen runterregulierte mRNA in der ventralen Prostata der Ratte, die für SGP-2 (Clusterin) codiert. Im Körper und im Schwanz des Nebenhodens der Ratte konnte ebenfalls eine Runterregulation der mRNA-Expression von Clusterin nachgewiesen werden (Cyr u. Robaire 1992). In einem *in Vitro*-Modell an LNCaP-Zellen konnte eine Isoform des humanen Clusterin nachgewiesen werden, dessen Expression nicht von Testosteron runterreguliert wird (Cochrane et al. 2006).

Eine solche von Testosteron nicht runterregulierte Isoform ist für die Ratte nicht beschrieben, deren Existenz kann aber nicht generell ausgeschlossen werden. Der Focus wurde auf Clusterin der Ratte NM_053021 gelegt, das als von Testosteron runterreguliert angesehen wird. Die Primer für die RT-qPCR als auch die Antikörper für den ELISA wurden anhand entsprechender Sequenz ausgewählt.

Die Zellen wurden mit den Testosteronkonzentrationen 10^{-5} M bis 10^{-9} M stimuliert um mögliche Effekt zu sehen. Sowohl in den 93RShAR17- als auch in den 93RShAR33-Zellen konnte lediglich bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-6} M und bei den 93RShAR17 zusätzlich bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-7} M eine schwache Veränderung der Genexpression mRNA-Ebene gemessen werden. Die zur Stimulation verwendeten Testosteronkonzentrationen sind teilweise sehr hoch und sind *in Vivo* bei der Ratte deutlich niedriger (Resko et al. 1968; Podesta et al. 1974). Allerdings kann ein *in Vitro*-System nicht eins zu eins auf die Verhältnisse *in Vivo* übertragen werden. Es konnte andererseits von Yon et al. (2007) gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Clusterin bei 5 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten durch eine orale Testosterontagesdosis von 50 $\mu\text{g/kg/Tag}$ zu einer signifikanten Hochregulation führte. Eine orale Testosterontagesdosis von 200 und 1000 $\mu\text{g/kg/Tag}$ hingegen führte zu einer signifikanten Runterregulation der mRNA-Expression von Clusterin. Bei diesem Versuch ist *in Vivo* erst nach einer sehr hohen Testosterongabe eine Runterregulierung von Clusterin gemessen worden. In den definierten *in Vitro* Systemen mit 93RShAR17 und 93RAhAR33 Zellen wird daher angenommen, dass die signifikanten Unterschiede in der gemessenen Menge an Clusterin (ng/ml) in sofern

dosisabhängig sind, als dass es in diesen *in Vitro* Systemen nur in diesen hohen Testosteronkonzentrationen überhaupt eine Regulation gab.

Die Expression von Clusterin als über den AR reguliertes und damit vermeintlich testosteronabhängiges Gen wurde auf mRNA und Proteinebene gemessen. In den beiden stabil mit einem humanen AR transfizierten Zelllinien 93RShAR17 und 93RShAR33 konnte eine Veränderung der Genexpression und eine reduzierte Proteinkonzentration von Clusterin im Vergleich zu den untransfizierten 93RS2-Zellen gefunden werden. Die Versuchsbedingungen konnten für diese Zellsysteme normiert werden und sind nahezu identisch. Im Vergleich der beiden mit den AR exprimierenden Zellsysteme konnten ebenfalls Unterschiede in der Proteinkonzentration von Clusterin gemessen werden. Die Längen des CAG-Repeats im jeweiligen hAR liegen weit auseinander und es gibt einen statistisch signifikanten Unterschied in der Proteinkonzentration an Clusterin zwischen dem AR17 und dem AR33.

Neonen et al. zeigten 2010 in einer Promotorstudie, dass ein AR mit einer CAG-Repeat-Länge im physiologischen Mittel bezüglich der Transkription aktiver ist, als ein AR mit kürzerem oder längerem Repeat. Wohingegen mehrere Studien auf mRNA- und auf Proteinebene keine Korrelation zwischen einem verlängerten CAG-Repeat und einer fehlerhaften Spermatogenese und oder Unfruchtbarkeit sehen (Dadze et al. 2000; Rajpert et al. 2002; Westerfeld 2008). Keine Abweichung vom physiologischen Mittel in der CAG-Repeat-Länge fanden Badran et al. (2009), zwischen einer Gruppe von 129 klinisch ausgesuchten infertilen Männern und einer aus 52 fertilen Männern bestehenden Kontrollgruppe. Die DNA des AR wurde hierzu aus dem peripheren Blut amplifiziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die CAG-Repeat-Länge lediglich einen Einfluß auf die Fertilität haben kann, aber dass die CAG-Repeat-Länge nicht allein für eine Infertilität verantwortlich gemacht werden kann. In einer kontrollierten klinischen Studie aus Finnland an 62 infertilen Männern, und 60 Männern mit normaler Spermatogenese, fanden Lund et al. (2003) bei zwei Männern eine Mutation am Beginn der Transaktivierungs-Domäne des AR. Diese konnte bei den anderen 60 infertilen Männern nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass die Regulation von dem AR nachgeschalteten Genen nicht nur, vielleicht nicht mal maßgeblich durch die CAG-Repeat Länge beeinflusst wird. Die Daten von Huhtaniemi et al. aus 2009 legen nahe, dass eine herabgesetzte Rezeptoraktivität bis zu einem gewissen Punkt mit einem erhöhten Testosteronspiegel abgefangen werden

könnte. Des Weiteren steige auch das Level an Östrogen proportional mit dem Testosteron, was dann wiederum die Fruchtbarkeit beeinflussen könne.

Zusammenfassend konnten in zwei unterschiedlichen stabil mit einem hAR transfizierten Sertoli-Zelllinien die Expression des humanen AR und des für die Spermatogenese relevanten Gens Clusterin nachweisen werden. Es zeigten sich bei beiden Zellsysteme leichte Unterschiede in der Genexpression von Clusterin auf mRNA-Ebene, nach Stimulation mit zwei hohen Testosteronkonzentrationen (10^{-6} M und 10^{-7} M). Auf Proteinebene konnte nach Stimulaton mit Testosteron in denselben beiden Konzentrationen bei Clusterin eine statistisch signifikant unterschiedliche Proteinkonzentration (ng/ml) gemessen werden. Dies bezog sich auf die beiden transfizierten Zelllinien 93RShAR17 und 93RShAR33 im Vergleich zu den untransfizierten 93RS2-Zellen. Die Unterschiede waren aber gemessen an der absoluten Proteinkonzentration (ng/ml) gering, so dass nicht von einer biologischen Relevanz ausgegangen werden konnte. Es schien für diese *In Vitro*-Modelle eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der Konzentration von Testosteron zu bestehen. Diese aber in dem Zusammenhang, bei welchen Konzentrationen konnten im Vergleich zu den untransfizierten Zellen überhaupt Veränderungen auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene beobachtet werden.

Ein Rückschluß ob der AR mit einer CAG-Repeat-Länge von 17 im Vergleich zum AR mit der CAG-Repeat-Länge 33 bei unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen mehr oder weniger aktiv ist und ob dadurch das androgenregulierte Gen Clusterin stärker exprimiert wird, konnte nicht gezogen werden.

In einer weiterführenden Arbeit von Fietz et al. (2015) bestand das Interesse darin zu untersuchen, welche anderen Gene in den beiden Zellsystemen nach Testosteronstimulation überhaupt reguliert werden und welche davon wiederum einen Bezug zur Spermatogenese haben. Diese Untersuchung wurde mittels Micro-Array durchgeführt und es zeigten sich 672 regulierte Gene, davon 200 hochreguliert und 472 runterreguliert, wobei 24 Gene als Kandidaten Gene für die Spermatogenese identifiziert werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion des AR an sich schon zu einer Veränderung der Genexpression in den Sertoli-Zellen führt. Diese Effekte wurden ohne eine Stimulation mit Testosteron gemessen, was eine wichtige Erkenntnis in Bezug auf Daten, die auf *in vitro* Zellsystemen beruhen, in denen Sertoli-Zellen ohne eigenen AR mit einem solchen transfiziert werden, darstellt.

6. Zusammenfassung

Androgene spielen für den Ablauf der Spermatogenese eine Schlüsselrolle. Ihre Wirkung wird über den Androgenrezeptor (AR) vermittelt, dessen genetische Information sich auf dem X-Chromosom befindet und aus 8 Exonen besteht. Exon 1 codiert für eine repetitive Sequenz, das sogenannte CAG-Repeat. Die Länge des CAG-Repeat variiert physiologisch von 9 bis 36 Repeats. Es gibt bezüglich der CAG-Repeat-Länge und dessen Einfluß auf die androgenabhängige Transaktivierung des AR verschiedene Ergebnisse. Einige Autoren sehen einen Zusammenhang mit der CAG-Repeat-Länge, andere nicht.

In dieser Arbeit ist anhand eines neu entwickelten Sertoli-Zellmodells dieser Zusammenhang exemplarisch an der mRNA- und Proteinexpression von Clusterin (Sulphated Glycoprotein-2), einem ubiquitär exprimierten Glykoprotein, untersucht worden. Clusterin ist ein ursprünglich in der Prostata gefundenes Androgen-reprimiertes Gen, das im Hoden hauptsächlich in Sertoli-Zellen exprimiert wird. Clusterin wird mit einer Reihe von physiologischen Funktionen, wie Zell-Zell-Interaktionen und Apoptose in Zusammenhang gebracht. Daher erschien Clusterin als ein guter Marker für die geplanten Untersuchungen

Zunächst wurden zwei komplette hAR mit den CAG-Repeat Längen 18 und 36 in einen Expressionsvektor mit einem anhängenden GFP kloniert. Jeder dieser beiden Vektoren wurde in die präpubertären Ratten-Sertoli Zellen 93RS2 transfiziert, die keinen eigenen AR exprimieren. Die zwei neuen Sertoli Zelllinien *93RShAR18* und *93RShAR36* wurden mittels RT-PCR, quantitativer RT-PCR und Western Blot charakterisiert, um sicherzustellen das der transfizierte hAR exprimiert wird und sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Nach der Stimulation mit Testosteron konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die CAG-Repeat-Länge bei der Replikation in den Zelllinien geändert hatte. Die Bestimmung der CAG-Repeat-Länge erfolgte durch eine SDS-PAGE-PCR. Es zeigte sich der Verlust eines CAG bei den *93RShAR18* und der Verlust von 3 CAG bei den *93RShAR36*, daher wurden die Zellen für die Stimulationsversuche in *93RShAR17* und *93RShAR33* umbenannt.

Ohne die Stimulation mit Testosteron konnten in den beiden Zelllinien *93RShAR17* und *93RShAR33* nahezu identische Expressionslevel von hAR und Clusterin gezeigt werden. Nach Stimulation mit Testosteron ergaben sich lediglich bei der

Testosteronkonzentration von 10^{-6} M in dem 93RShAR33-Zellensystem und bei den Testosteronkonzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M in dem 93RShAR17-Zellsystem leichte Veränderungen in der Genexpression von Clusterin. Im Vergleich der beiden Zellsysteme 93RShAR17 und 93RShAR33 ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede in der Expression von Clusterin und dem hAR auf mRNA-Ebene. Auf Proteinebene konnten mittels ELISA nach Stimulation mit den Testosteronkonzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M über 48 Stunden statistisch signifikante Unterschiede in der Clusterinkonzentration (ng/ml) im Vergleich der beiden Zellsysteme mit den untransfizierten 93RS2-Zellen, als auch im Vergleich der Zellsysteme untereinander gemessen werden. Diese Unterschiede waren gering, so dass ihnen keine wirklich unterschiedliche Transkriptionsaktivität des AR unterstellt und damit eine biologische Bedeutung beigemessen werden konnte. Für diese beiden Zellsysteme konnte somit kein relevanter Unterschied in der Transaktivierungsfunktion des AR mit unterschiedlicher CAG-Repeat-Länge innerhalb der physiologischen Varianz, bezogen auf die Expression von Clusterin, gefunden werden.

In einer weitergehenden Arbeit mit diesen Zellsystemen konnte an mehreren Kandidatengenen für die Spermatogenese gezeigt werden, dass nur die Transfektion des AR, ohne eine Testosteronstimulation, schon zu einer veränderten Expression führte.

7. Summary

Androgens play key roles in spermatogenesis. Their effects are mediated by the androgen receptor (AR), being located on the X chromosome and consisting of 8 exons. Exon 1 encodes a polyglutamine (CAG) repeat with a polymorphic length between 9 and 36. A connection between the CAG repeat length and the testosterone dependent transactivation of the AR is still in discussion.

We want to examine this possible connection exemplary for AR dependent genes at the mRNA- and protein expression of clusterin (Sulphated Glycoprotein-2, Clu). Clu is one of the major proteins secreted by Sertoli cells in the testis. It was first lokalised in prostate and is known as an Androgen depressed gen, with a variety of physiological roles. So it might be predestined it as a good marker for this present studie.

First two full length human AR (hAR), CAG repeat length 18 and CAG repeat length 36 were created and cloned into an expression vector with a terminal GFP. Each of them was transfected in the prepubertal rat Sertoli cell line 93RS2. Before transfection it was assured that this cell line does not express an own AR by PCR. The new cell lines 93RShAR18 (18 CAG) and 93RShAR36 (36 CAG) were characterized by RT-PCR, quantitative RT-PCR and Western blot. So the expression of the transfected hAR could be varified in the two new Sertoli cell lines *93RShAR18* and *93RShAR36* as well on mRNA- as on protein level. After stimulation with testosterone, it was necessary to review the sequence of the AR, because in the Sertoli cells CAG repeats could get lost by replication failure. We lost one CAG in the 93RShAR18 and three CAG in the 93RShAR36 cells. So for the stimulation experiments we renamed the cells in *93RShAR17* and *93RShAR33*.

Without testosterone stimulation the mRNA expression of hAR and Clu in the transfected cell lines was nearly equal. The mRNA expression of hAR after stimulation with testosterone in five different concentrations seems only minor regulated. Only minor differences in Clu mRNA expression by quantitative RT-PCR in comparison of the transfected cell lines *93RShAR17* and *93RShAR33* among themselves and in comparison of the transfected cell lines *93RShAR17* and *93RShAR33* with the untransfected 93RS2 cells was found. The Clu mRNA expression in the 93RShAR33 only showed a minor alteration at 10^{-6} M in the 93RShAR17 at 10^{-6} M and 10^{-7} M. In comparison between the two transfected Sertoli cell lines among themselves, and

among the untransfected 93RS2 cell line a significant difference in the protein expression of Clusterin could be detected. But this difference is relatively small, so it could not be attached to a biological relevance. For these two Sertoli cell models a supposed measurable difference in transactivation of hAR with different CAG repeat length in a physiological range by the protein-expression of Clu did not exist.

In a further study of candidate genes for spermatogenesis, it was shown by microarray, that only the transfection of the hAR, without stimulation of testosterone, already had effects on the expression of these candidate genes of spermatogenesis.

8. Literaturverzeichnis

- Andrew SE, Goldberg YP, Hayden MR.** (1997) Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum Molec Gen* 6(12): 2005-2010.
- Aronow BJ, Lund DS, Brown TL, Harmony JAK, Witte DP** (1993) Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: Potential role in barrier cytoprotection. *Proc Nat Acad Sci USA* 90: 725-729.
- Babran WA, Fahmy I, Abdel-Megid WM, Elder K, Mansour R, Kent.First M.** (2009) Length of androgen receptor CAG repeats in fertile and infertile Egyptian men. *J Androl* 30(4) 416-425.
- Baum C** (1994) An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* 17: 1058-1062.
- Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC.** (2010) Molecular cell biologie of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 42(6): 813-827.
- Berg von, GL** (2001) Grundstudium Biologie: Genetik. (Hrsg.) Munk K. Spektrum **10-24 – 10-28.**
- Bergmann M, Nashan D, Nieschlag E.** (1989) Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res.* 256: 183-190.
- Bergmann M** (2005) Spermatogenesis – physiologie and pathophysiologie. *Urology A.* 44 (10): 1131-1138.
- Bergmann M, Kliesch S.** (2010) Testicular biopsy and histologie. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg.) *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunktion.* Springer; S.155-167.
- Bettuzzi S, Hiipakka A, Gilna P, Liao S.** (1989) Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequenced analysis. *Biochem J* 257: 293-296.
- Blaschuk O, Burdzy K, Fritz B.** (1983) Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 12: 7714-7720.
- Bowater RP, Rosche WA, Jaworski A, Sinden RR, Wells RD.** (1996) Relationship between Escherichia coli growth and deletions of CTG.CAG triplet repeats in plasmids. *J Mol Biol* 264(1): 82-96.
- Bremner WJ, Millar MR, Scharpe RM, Saunders PT.** (1994) Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage dependant expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135: 1227-1234.
- Brown Cj, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF.** (1989) Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 44: 264-269.
- Bruning G, Dietrichs R, Stumpel C, Bergmann M.** (1993) Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia* 25: 311-316.
- Bryan O` MK, Mallidis C, Murphy BF, Baker HWG.** (1994) Immunohistological Localization of clusterin in the Male Genital Tract in Humans and Marmosets. *Biol Reprod* 50: 502-509.
- Chang C, Kokontis J, Shutsung L.** (1988) Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7211-7215.
- Chen C, Okayama H.** (1987) High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7(2): 745-752.
- Chen C, Okayama H.** (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 6: 632-638.
- Choi-Miura NH, Oda T.** (1996) Relationship between multi-funktional protein clusterin and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 17(5): 717-722.
- Choong CS, Kemppainen JA, Zhou ZX, Wilson EM.** (1996) Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol* 10: 1527-1535.

Claessens F, Verijdt G, Haelens A, Callewaert L, Moerhrens U, Alesio d'A, Tannet T, Schauwaers K, Daneyer S, Tilborgh van N. (2005) Molecular biology of the androgen responses. *Andrologia* 37: 209-210.

Clermont Y, Leblond C. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous Epithelium in the Rat. *Biology of the Testis* 55: 548-573.

Clermont Y. (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112: 35-51.

Cochrane DR, Wang Z, Muramaki M, Gleave ME, Nelson CC. (2007) Differential Regulation of Clusterin and its Isoforms by Androgens in Prostate Cells. *J Biol Chem* 282(4): 2278-2287.

Coffey K, Robson CN. (2012) Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J. Endocrinol* 215: 2221-237.

Collard MW, Griswald MD. (1987) Biosynthesis and molecular cloning of sulphated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry* 26: 3297-3303.

Collins LL, Lee HJ, Chen YT, Chang M, Hsu HY, Yeh S, Chang C. (2003) The androgen receptor in spermatogenesis. *Cytogen Gen Res* 103: 299-301.

Cyr DG, Robaire B. (1992) Regulation of sulphated glycoprotein-2 (clusterin) messenger ribonucleic acid in the rat epididymidis. *Endocrinology* 130(21): 2160-2166.

Davis-Dao CA, Tuazon ED, Sokol RZ, Cortessis VK. (2007) Male infertility and variation in CAG repeat length in the androgen receptor gene: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 92(11): 4319-4326.

Dazde S, Wieland C, Jakubiczka S, Funke K, Schröder E, Royer-Pokora B, Willers R, Wieacker PF. (2000) The size of CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucasoid sample of german origin. *Mol Hum Reprod* 6(3) 207-214.

Dowsing AT, Yong EL, Clark M, Mc Lachlan R, Kretser de DM, Trounson AO. (1999) Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet* 354: 640-643.

Dym M, Fawcett DW. (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3(3): 308-326.

Eckardstein S von, Syska A, Gromoll J, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E. (2001) Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6): 2585-2590.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringolds GM, Danielsen M. (1987) Lipofection. A Highly Efficient, Lipid Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417.

Fietz D, Geyer J, Kliesch S, Gromoll J, Bergmann M. (2011) Evaluation of CAG repeat length of androgen receptor expressing cells in human testes showing different pictures of spermatogenic impairment. *Histochem Cell Biol* 136: 689-697.

Fietz D, Markmann M, Lang D, Konrad L, Geyer J, Kliesch S, Chakraborty T, Hossain H, Bergmann M. (2015) Transfection of Sertoli cells with androgen receptor alters gene expression without androgen stimulation. *BMC Mol Biol* 16: 23 doi:10.1186/s 12867-015-0051-7.

Frey A, Bade S, Peterson A. (2007) Detektion von Proteinen auf Membranen in Situ. Jahnson M (Hrsg) *Gentechnische Methoden* 4. Auflage; S.395-421.

Fritz IB, Burdzy K, Setchell B, Blaschuk O. (1983) Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* 28: 1173-1188.

Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ. (1996) Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59: 9-20.

Gelmann EP. (2002) Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20(13): 3001-3015.

Germain P, Steals B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58(4): 685-705.

Good L, Nazar RN (1997) Plasmid mini-preparations from culture streaks. *BioTechniques* 22: 404-404.

- Gottlieb B, Pinsky L, Beitel LK, Trifiro M** (1999) Androgen Insensitivity Syndrome. *Am J Med Genet* 89(4): 210-217.
- Grima J, Zwain I, Lockshin RA, Bardin CW, Cheng CY.** (1990) Diverse secretory patterns of clusterin by epididymidis and prostate/seminal vesicles undergoing cell regression after orchiectomy. *Endocrinology* 126: 2989-2997.
- Griswold MD.** (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9(4): 411-416.
- Gusella JF, MacDonald ME.** (1995b) Huntington's disease: CAG genetics expands neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 5(5): 656-662.
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA.** (1992) The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* 66: 2125-2134.
- Hayflick L, Moorhead PS** (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Heikau S, Winterhager E, Traub O, Grummer R.** (2002) Responsiveness of endometrial genes Connexin26, Connexin43 C3 and Clusterin to primary estrogen, selective estrogen receptor modulators, phyto- and xenoestrogens. *J Mol Endocrin* 29(2): 239-249.
- Hose KA, Häffner K, Fietz D, Grooll J, Eckert T, Kliesch S, Siebert H, Bergmann M** (2009) A novel sequence variation in the transactivation regulating domain of the human androgen receptor. *Fertil Steril* 92 (1):390.e9-390.e11.
- Hu G** (1993) DNA polymerase-catalyzed addition of non-templated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol* 12: 763-770.
- Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL, Thomson W, O'Neill TW, Platt H, Payne D, John SL, Jiang M, Boonen S, Borghs H, Vanderschueren D, Adams JE, Ward KA, Bartfai G, Casanueva F, Finn JD, Forti G, Givercman A, Han TS, Kula K, Lean MEJ, Pendleton N, Punab N, Silman AJ, WU FCW** (2009) Increased estrogen rather than decreased androgen action is associated with longer androgen receptor CAG repeats. *J Clin Endocrinol Metab* 94(1): 277-284.
- Irvine RA, Ma Y, Yu MC, Ross RK, Stallcup MR, Coetzee GA.** (2000) Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum mol Genet* 9(2): 267-274.
- Jiang C, Hall SJ, Boekelheide K.** (1997) Development and characterization of a prepubertal rat Sertoli cell line, 93RS2. *J Androl* 18(4): 393-399.
- Jones SE, Jomary C.** (2002) Molecules in focus: Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 427-431.
- Jordan M, Wurm F.** (2004) Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate. *Methods* 33(2): 136-143.
- Jordan-Starck TC, Lund SD, Witte DP, Aronow BJ, Ley CA, Stuart WD, Swertfeger DK, Clayton L, Sells SF, Paigen B, Harmony JAK.** (1994) Mouse apolipoprotein J: characterization of a gene implicated in atherosclerosis. *J Lipid Res* 35: 194-210.
- Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H.** (1993) Immunohistochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 41(5): 671-678.
- Konrad L, Munir Keilani M, Cordes A, Völck-Badouin E, Laible L, Albrecht M, Renneberg H, Aumüller G.** (2004) Rat Sertoli cells express epithelial but also mesenchymal genes after immortalization with SV40. *Biochim Biophys Acta* 1722(1): 6-14.
- Kormano M.** (1967) Development of the Rectum-Testis temperature difference in the post natal rat. *J Reprod Fert* 14: 427-437.
- König HE, Liebig H-G** (2002) Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculine). *Anatomie der Haussäugetiere: Organe,-Kreislauf- und Nervensystem. 2. Auflage.* Schattauer; S.121- 127.
- Kühnel W.** (2002) Leydig-Zellen. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11. Auflage.* Thieme; S.384.
- La Sprada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE.** (1991) Androgen receptor gene mutations in x-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-79.
- Latchman DS.** (1997) Transcriptional factors: An overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29(12): 1305-1312.

- Lee H, Chang C.** (2003) Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life sci* 60(8): 1613-1622.
- Li F, Yamaguchi K, Okada K, Matsushita K, Enatsu N, Chiba K** (2013) Efficient transfection of DNA into primarily cultured rat sertoli cells by electroporation. *Biol Reprod* 88(3): 61.
- Liebig H-G.** (2003) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4. Auflage. Schattauer; S.279-281.
- Lopata MA, Cleveland DW, Sollner-Webb B.** (1984) High Level Transient Expression of a Chloramphenicol Acetyl Transferase Gene by DEAE-Dextran Mediated Transfection Coupled with a Dimethyl Sulfoxide or Glycerol Shock Treatment. *Nucl Acid Res* 12(5): 707-717.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM.** (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240: 327-330.
- Lubahn DB, Tan JA, Quarmby VE, Sar M, Joseph DR, French FS, Wilson EM.** (1989) Structural analysis of the human and rat androgen receptors and expression in male reproductive tract tissues. *Ann N Y Acad Sci* 564: 48-56.
- Lund A, Tapanainen JS, Lähdetie J, Savantous ML, Aittomäkidh K.** (2003) Long CAG repeats in the AR gene are not associated with infertility in Finnish males. *Acta Obst Gyn Scan* 82(2): 162-166.
- Maclean JA 2nd, Chen MA, Wayne CM, Bruce SR, Rao M, Meistrich ML, Macleod C, Wilkinson MF.** (2005) RhoX: a new homeobox gene cluster. *Cell* 120: 369-382.
- Marchuck D, Drum M, Collins FS.** (1991) Constructions of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl Acid Res* 19: 1154.
- Mayerhofer A, Vogt H, Zanner R.** (2005) Männliche Geschlechtsorgane. In Gratzl M (Ed.) *Histologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg; S.369-384.
- McEwan IJ.** (2004) Molecular mechanisms of androgen receptor-mediate gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer* 11(2): 281-293.
- McNultyDE, Claffe BA, Huddleston MJ, Porter ML, Kavnar KM, Kane JF.** (2003) Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 27(2): 365-374.
- Mifsud A, Sim CKS, Boettger-tong H, Moneira S, Lamb DJ, Lipsultz LI, Yong EL.** (2001) Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil Steril* 75(2): 275-281.
- Miyake H, Chi KN, Gleave ME.** (2000) Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 6(5):1655-1633.
- Moe SE, Sorbo JG, Holen T.** (2008) Huntington triplet-repeat locus is stable under long term Fen1 knockdown in human cells. *J Neurosci Methods* 171(2): 233-238.
- Morales C, Hugly S, Griswold MD.** (1987) Stage dependent levels of specific mRNA transcripts in Sertoli cells. *Biol Reprod* 36(4): 1035-1046.
- Mueller SO, Korach KS.** (2001) Immortalized Testis Cell Lines From Estrogen Receptor (ER) α Knock-Out and Wild-Type Mice Expressing Functional ER α or ER β . *J Androl* 22(4): 652-664.
- Nakanishi Y, Shiratsuchi A.** (2004) Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 27(1): 13-16.
- Neonen H, Björk C, Skjaerpe P-A, Giverman A, Rylander L, Svartberg J, Lundberg Giverman Y.** (2010) CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro. *Mol Hum Rep* 16(3): 153-157.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH.** (1982) Gene Transfer into Mouse Myeloma Cells by Electroporation in High Electric Fields. *EMBO J* 1: 841-845.
- Nicholas JS** (1961) Ross Granville Harrison 1870-1959. A Biographical Memoir, National Academy of Sciences.
- Nieschlag E, Behre HM.** (2009) Endokriner Regelkreis und relative Bedeutung von LH und FSH für die Spermatogenese. *Andrologie*. 3. Auflage. Springer; S.34-38.

- O'Schaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H.** (2006) The foetal Leydig cell. Differentiation, Function and Regulation. *Int J Androl* 29(1): 90-95.
- O'Schaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ.** (2002) Failure of normal Leydig cell Development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci* 115: 3491-3496.
- Pearson CE, Sinden RR.** (1998) Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8(3): 321-330.
- Pelletier C, Labrie C and Labrie F.** (2000) Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrin* 5(2): 359-370.
- Plotton I, Sanches P, Perrard MD, Durand P and Lejeune H.** (2005) Quantification of stem cell factor mRNA levels in rat testis: usefulness of clusterin mRNA as a marker of the amount of mRNA of Sertoli cell origin in post pubertal rats. *J Endocrin* 186(1): 131-143.
- Podesta EJ, Rivarola MA.** (1974) Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rat at different stages of development. *Endocrin* 95(2):455-461.
- Quigley CA, Bellis De A, Marschke KB, Awady EI MK, Wilson EM, French FS.** (1995) Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular Perspectives. *Endocrine Reviews* Vol 16 No 3 pp: 271-321.
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K.** (2007) Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl* 9(2): 147-179.
- Rajpert-DE Meyers E, Leffers H, Petersen JH, Andersen AG, Carlsen E, Jorgensen N, Shakkeback NE.** (2002) CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet* 359: 44-46.
- Regadera J, Martinez-Garcia F, Gonzales-peramato P, Serrano A, Nistal M, Soares-Quian C.** (2001) Androgen Receptor Expression in Sertoli Cells as a Function of Seminiferous Tubule Maturation in the Human Cryptorchid Testis. *J Clin Endocrin Metab* 86 (1): 413-421.
- Resko JA, Feder HH, Goy RW.** (1968) Androgen concentration in Plasma and Testis of Developing Rats. *J Endocrin* 40: 485-491.
- Richards RI, Sutherland GR.** (1994) Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet* 17(3): 114-116.
- Rose JK, Buonocore L, Whitt MA** (1991) A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques* 10: 520-525.
- Rosemblit N, Chen CLC.** (1994) Regulators for the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements. *J Molec Endocrin* 13: 69-76.
- Rosenberg ME, Silkensen J.** (1995) Clusterin: Physiologic and Pathophysiologic Considerations. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(7): 633-645.
- Sadar MD.** (2011) Small Molecule Inhibitors Targeting the „Achilles Heel“ of Androgen Receptor Activity. *Cancer Res* 71(14): 1208-1213.
- Samadashwilly GM, Raca G, Mirkin SM.** (1997) Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nat Genet* 17(3): 298-304.
- Scharf SJ, Hirn GT, Ehrlich HA.** (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233: 1076-1078.
- Schmitz S** (2007) Der Zellzyklus. Der Experimentator: Zellkultur. Elsevier 1.Auflage: S. 12-14; 31-35.
- Schnorr B, Kressin M.** (2001) Entwicklung der Geschlechtsorgane. Embryologie der Haustiere. Enke 4. völlig neu gestaltete Auflage: S.180-194; S.3-11.
- Sgamarella V, Khorana HG.** (1992) A further study of the T4 ligase-catalyzed joined of DNA at base paired ends. 1972. *Biotechnology* 24: 28-37.
- Shan L-X, Wayne Bardin C, Hardy MP.** (1997) Immunohistochemical Analysis of Androgen Effects on Androgen Receptor expression in Developing Leydig and Sertoli Cells. *Endocrinology* 138(3): 1259-1266.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fischer JS.** (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorder of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6): 769-784.

- Shimizu M, Gellibolian R, Oostra BA, Wells RD.** (1996) Cloning, characterization and properties of plasmids containing CGG triplet repeats from the FMR-1 gene. *J Mol Biol* 258 (4): 614-626.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.** (1962) Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39.
- Shuman S.** (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotidesynthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269: 32678-32684.
- Sertoli E.** (1865) Dell' esistenza di particolari cellule ramificante nei cunicoli seminiferi del testicoli umano. *Morgani* 7:31-40.
- Sigg C** (1979) Classification of tubular testicular atrophies in the diagnosis of sterility. Significance of the so-called „bunte Atrophie“. *Schweiz Med Wochenschr* 109: 1284-1293.
- Skinner MK, Schlitz SM, Anthony CT.** (1989) Regulation of Sertoli cell differentiated function: testicular transferrin and androgen-binding protein expression. *Endocrinol* 124(6). 3015-24.
- Sleddens HF, Oostra BA, Brinkmann AO, Trapman J.** (1992) Trinucleotide repeat polymorphism in the androgen receptor gene (AR). *Nucleic Acids Res* 20:1427.
- Sneddon SF, Walther N, Saunders PT.** (2005) Expression of androgen and estrogen receptors in Sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line. *Endocrinology* 146 (12): 5304-5312.
- Southern EM.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 (3): 503-517.
- Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M.** (1999) Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod* 14:136-143.
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M.** (2000) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 6 (3): 219-225.
- Steger K.** (2001) Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reproduktionsmedizin*. 17: 137-148.
- Suarez-Quain CA, Martinez-Garcia F, Nistal M, Regadera J.** (1999) Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 350-358.
- Suh JH, Shong M, Choi HS, Lee K.** (2008) CR6-interacting factor 1 represses the transactivation of androgen receptor by direct interaction. *Mol Endocrinol* 22(1): 33-46.
- Sukharev SI, Titomirov AV, Klenchin VA.** (1994) Electrically-Induced DNA Transfer into Cells. *Electrotransfectin in Vivo*. Wolff JA (Hrsg.); Birkhäuser. *Gene Therapeutics. Methods and Applications of Direct Gene Transfer*. 210-232.
- Svechnikow K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colon E, Svechnikowa, Söder O.** (2010) Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* 73(2): 93-101.
- Sylvester S, Morales C, Oko R, Griswold MD.** (1991) Localization of Sulfated Glycoprotein-2 (Clusterin) on Spermatozoa and in the Reproductive Tract of the male Rat. *Biol Reprod* 45: 195-207.
- Takai T, Ohmori H.** (1990) DNA Transfection of Mouse Lymphoid Cells by the Combination of DEAE-Dextran-Mediated DNA Uptake and Osmotic Shock Procedure. *Biochem Biophys Acta* 1048: 105-109.
- Tilley WD, Marcelli M, Wilson JD, McPhaul MJ.** (1989) Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc. Natl Acad Sci USA* 86: 327-331.
- Tsai MJ, O'Malley BW.** (1994) Molecular mechanisms of action of Steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486.
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL.** (1997) Long Polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3777-3782.
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quain CA.** (1994) Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinologie* 134 (5): 2307-16.
- Walther N, Jansen M, Ergun S, Kascheike B, Ivell R.** (1996) Sertoli cell lines established from H-2Kb-tsA58 transgenic mice differentially regulate the expression of cell specific genes. *Exp Cell Res* 225: 422-421.

- Wang R, Yeh S, Chen L, Lin H, Zhang C, Ni J, Wu C, Di Sant`Agnese PA, deMesy-Bentley KI, Tzeng C, Chang C.** (2006) Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 147(12): 5624-5633.
- Weider K, Bergmann M, Brehm R.** (2011) Connexin 43 its regulatory role in testicular junction dynamics and spermatogenesis. *Histol Histopathol* 26 (10): 1343-52.
- Weinbauer G, Luetjens C, Simoni M, Nieschlag E.** (2010) Physiology of Testicular Funktion. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunktion*. Springer; S. 11-59.
- Weinbauer GF, Nieschlag E.** (1998) The role of testosterone in spermatogenesis. *Testosterone Action Deficiency Substitution*, eds. Nieschlag E u. Behre, H.M. 143-168. Springer.
- Westerveld H.** (2008) CAG repeat length variation in the androgen receptor gene is not associated with spermatogenic failure. *Fertil Steril* 89 (1): 253-259.
- Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M.** (1994) Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 221: 917-925.
- Wünsche W, Tenniswood MP, Schneider MR, Vollmer G.** (1998) Estrogenic regulation of clusterin mRNA transcripts in Sertoli cells. *Biol Reprod* 36(4): 1035-1046.
- Yon JM, Kwak DH, Cho YK, Lee S-R, Jin Y, Baek iJ, Lee Je, Nahm S-S, Choo Y-K, Lee BJ, Yun YW and Nam S-Y.** (2007) Expression pattern of Sulphated Glycoprotein-2 (SGP-2) mRNA in Rat testes Exposed to Endocrine Disruptors. *J Reprod Dev* 53: 1007-1013.
- Yoshida KI, Yao M, Chiba K, Honda M, Kithahara S.** (1999) CAG repeat length n the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia. *Urology* 54: 1078-4057.1081.
- Yu A, Dill J, Mitas M.** (1995) The purine-rich trinucleotide repeat sequences d (CAG) an d (GAC) form hairpins. *Nucleic Acid Res* 23 (20): 4055-4057.
- Zitzmann M** (2009) The role of the CAG repeat androgen receptor polymorphism in andrology. *Front Horm Res* 37:52-61.
- Zühlke C, Riess O, Bockel B, Lange H, Thies U.** (1993) Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington disease gene. *Hum Mol Genet* 2(12): 2063 -2067.

9. Anhang

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Publikationen:

Fietz D, Markmann M, Lang D, Konrad L, Geyer J, Kliesch S, Chakraborty T, Hossain H, Bergmann M. Transfection of Sertoli cells with androgen receptor alters gene expression without androgen stimulation. BMC Mol Biol. 2015 Dec 29; 16:23. doi: 10.1186/s12867-015-0051-7.

Publizierte Abstracts:

In-vitro-system der androgenabhängigen Genexpression des humanen Androgenrezeptors mit unterschiedlicher CAG-Repeat-Länge. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2009; 6(5) S. 237.

Poster:

D. Lang, B. Döring, S. Kranz, J. Geyer, L. Konrad, M. Bergmann. In-vitro-system der androgenabhängigen Genexpression des humanen Androgenrezeptors mit unterschiedlicher CAG-Repeat-länge. 3. DVR-Kongress 11.-14.11.2009 in Freiburg.

D.Lang, B.Döring, S.Kranz, J.Geyer, L.Konrad, M.Bergmann. In vitro system of androgen dependent gene expression of the human AR with different CAG repeat length. 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung 23.-26.02.2010 in München.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Bergmann für die Überlassung des Themas, für die gute Betreuung und vor allen Dingen für aufmunternden, zuversichtlichen Worte bedanken. Bisweilen kann die Arbeit in der Zellkultur/Molekularbiologie für einen eingefleischten Praktiker wie mich doch sehr frustrierend sein.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Jörg Vogelsberg, ohne dessen tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur, aber auch bei der Umsetzung der geplanten Versuche, diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Außerdem danke ich Dr. Daniela Fietz für ihren geistigen und technischen Support, bis zum letzten Tag vor dem Einreichen dieser Doktorarbeit, Liebe Dani, vielen Dank dass du über die Jahre immer ein offenes Ohr für die immer wieder auftretenden Probleme, Katastrophen und Unwägbarkeiten hattest.

Neben den Unterstützern im eigenen Haus muss ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Joachim Geyer und Dr. Barbara Döring vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie bedanken, ohne eure Einarbeitung in die Grundlagen der Molekularbiologie und das oftmals nötige „trouble-shooting“ bei Versuchen, die einfach nicht funktionieren wollten, hätten diese dann wohl auch nicht funktioniert.

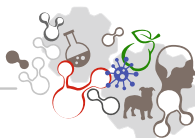
Außerdem danke ich Dr. Jörg Alber, Anita Neubauer und Regina Leidolf für die Einarbeitung in die Feinheiten der Laborarbeit sowie die vielen nützlichen und praktischen Tips zur Durchführung und Planung von anstehenden Versuchen.

Euch allen dafür ein großes „Danke Schön“.

Bei meiner Frau und meiner Tochter bedanke ich mich für die Unterstützung und das Verständnis, da ich die schriftliche Ausarbeitung dieser Arbeit neben meiner Tätigkeit in der Praxis nur sehr früh morgens oder spät abends und oder an den seltenen freien Wochenenden realisieren konnte, weshalb für andere Sachen dann leider oftmals wenig Zeit blieb. Danke.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung „guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Dennis Lang



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6581-2

